

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**Departamento de Fisiología**



**TESIS DOCTORAL**

**Organización de la capa plexiforme externa de la retina de  
las aves : fotorreceptores y células horizontales**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**María Antonia Gutiérrez Tarres**

**Madrid, 2015**

Maria Antonia Gutiérrez Tarrés

TP  
1984  
182



X-53-117519-6

ORGANIZACION DE LA CAPA PLEXIFORME EXTERNA DE LA RETINA DE LAS AVES:  
FOTORRECEPTORES Y CELULAS HORIZONTALES

Departamento de Fisiología  
Facultad de Medicina  
Universidad Complutense de Madrid  
1984



BIBLIOTECA

**Colección Tesis Doctorales. Nº 182/84**

© María Antonia Gutiérrez Tarrés  
Edita e imprime la Editorial de la Universidad  
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía  
Noviciado, 3 Madrid-8  
Madrid, 1984  
Xerox 9200 XB 480  
Depósito Legal: M-20382-1984

U N I V E R S I D A D   C O M P L U T E N S E  
F A C U L T A D   D E   M E D I C I N A

ORGANIZACION DE LA CAPA PLEXIFORME EXTERNA DE LA  
RETINA DE LAS AVES: FOTORRECEPTORES Y CELULAS  
HORIZONTALES \*

Ma. Antonia Gutierrez Tarrés

Tesis para aspirar al grado de  
Doctor en Medicina y Cirugía

Director: Prof. A. Gallego

CATEDRA I DE FISIOLOGIA

Madrid, 1982

\*Este trabajo ha sido realizado con la subvención de la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica dentro del proyecto 3823/79.





Universidad Complutense  
Facultad de Medicina  
Ciudad Universitaria  
Madrid - 3

DEPARTAMENTO DE FISILOGIA


Cátedra I de Fisiología

Prof. A. Gallego

ANTONIO GALLEGO FERNANDEZ, Catedrático de Fisiología General, Química Biológica y Fisiología Especial de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICA: Que el trabajo "Organización de la capa plexiforme externa de la retina de las aves: Fotorreceptores y células horizontales", realizado bajo mi dirección por Da. María Antonia GUTIERREZ TARRES, reúne las condiciones necesarias para ser presentado como Tesis Doctoral.

Madrid, 22 de Julio de 1982



A. Gallego



**A mis padres**

**Al Prof. Antonio Gallego**





#### IV

#### A G R A D E C I M I E N T O S

Al Prof. Antonio Gallego, director de esta Tesis, por su planteamiento de la misma y por su ayuda, tanto técnica como teórica, en su ejecución y en la interpretación de los resultados obtenidos.

A Rosa Ayllón, por su invaluable colaboración técnica, sin cuyo trabajo esta Tesis hubiera sido imposible. A Marisa Picazo por su ayuda técnica.

A Carmen Prada por su contribución a la discusión de los resultados obtenidos en retinas de embrión.

A Salomé Valiente y Alicia Atienza por su labor mecanográfica.

A Manuel Taboada por su ayuda en la realización de la iconografía de esta Tesis.



# I N D I C E

	<u>Págs.</u>
AGRADECIMIENTOS.....	IV
I.- INTRODUCCION	
A. Antecedentes históricos.....	1
B. La obra de Cajal y sus seguidores.....	5
C. Fotorreceptores.....	11
D. Células Horizontales.....	22
II.- OBJETIVOS.....	30
III.- MATERIAL Y METODOS.....	31
A. Material.....	31
B. Métodos.....	33
IV.- RESULTADOS.....	47
A. Fotorreceptores.....	47
Introducción y gotas lipídicas.....	47
Bastones.....	51
Conos dobles.....	54
Conos simples.....	59
Contactos entre fotorreceptores.....	64
Desarrollo embrionario.....	68
B. Células Horizontales.....	71
Célula horizontal de axón corto.....	71
Célula horizontal sin axón tipo I.....	75
Célula horizontal sin axón tipo II.....	76
Desarrollo embrionario de las células horizon- tales.....	78
C. Conexiones entre fotorreceptores y células ho- rizontales.....	83
D. Células Bipolares.....	87
V.- DISCUSION.....	93
VI.- CONCLUSIONES.....	110
VII.- BIBLIOGRAFIA.....	116
VIII.- LAMINAS.....	129



## I - INTRODUCCION

### A) ANTECEDENTES HISTORICOS

Fueron los sabios de la Grecia clásica quienes primero intuyeron la estructura reticular de la retina. Rufus de Efeso (Ruelle E. 1879) la denominó "aracnoides" por su gran similitud a una tela de araña y posteriormente Herofilo y Galeno (cit. por Polyak 1941) la llamaron "amphiblestroides", que significa red, retículo. La compararon a una red de pesca al ser sacada del agua, ya que cuando la retina está colapsada adopta este aspecto, lo que se produce frecuentemente al escindir el segmento anterior.

El diagrama (FIG. 1) más antiguo del ojo se encuentra en el libro de Hunain Ibn Ishak (Meyerhof M. 1928) fechado en el año 860 d.c. y probablemente copia del original griego. En él la retina recibe el nombre de "al-shabakiyya" (red) término traducido del griego por Avicena en su Canon de Medicina (Gruner 1930), donde describe la anatomía del ojo. La palabra árabe fue traducida al latín por "retia" o "retina" por Gerardo de Cremona (Sudhoff 1907) que tradujo numerosos libros árabes entre ellos el "Canon de Medicina" de Avicena.

Sin embargo, la función de la retina no fue conocida ni por los griegos, ni por los árabes. Galeno estableció la similitud que existía entre el aspecto de la retina y el cerebro, pero no le concedió más que una función puramente nutritiva, ya que pensaba que el órgano receptor era el cristalino y la retina sólo nutría al humor vítreo y al cristalino. Hunain Ibn Ishak atribuyó a la

retina una doble función, nutrir al humor vítreo por medio de sus vasos sanguíneos y a través de él indirectamente al cristalino, y a la vez transmitía las sensaciones a lo largo del nervio óptico hasta el cerebro transportando el "espíritu visual o pneuma" de nuevo al cristalino. Los árabes fueron los primeros en atribuir a la retina una función de transmisión, pero persistieron en mantener la teoría de la función nutritiva de la retina, idea que perduró durante siete siglos.

En 1604, Kepler (Plehn 1922) estableció la función fotorreceptora de la retina, pero hubieron de pasar muchos años aún hasta que la invención del microscopio permitiera que las teorías de Kepler fuesen demostradas y admitidas.

La era del microscopio fue iniciada por Malpigio (1664), en Italia por Leeuwenhoek (Priestly 1772) en Holanda, que prestó gran atención a la anatomía del ojo y concretamente a la retina, siendo el primero en describir los elementos oblongos de la capa bacilar (fotorreceptores), los capilares sanguíneos y las células nerviosas.

Durante la segunda mitad del siglo XVII y principios del XVIII, numerosos físicos, filósofos y fisiólogos se interesan por el órgano de la visión. Se avanza en el conocimiento de la estructura fibrosa de la retina a la que consideran como una simple expansión del nervio óptico, opinión adoptada por los físicos y fisiólogos de la época que aceptaron la teoría de que los rayos de luz estimulan directamente por vibración las células del nervio óptico, las cuales, en cooperación con los "espíritus de la visión" realizan la recepción y transmisión de las impresiones vi-

suales al cerebro donde los objetos son reconocidos por el "alma".

Hacia finales del siglo XVIII, el sistema nervioso y la retina se estudian sistemáticamente con la ayuda del microscopio.

Felice Fontana (1782) explicó que la retina era una simple membrana de fibras nerviosas, describió las fibras del nervio óptico y vió una trama celular donde estaban incluidos los "globulos nerviosos", refiriéndose posiblemente al armazón neuroglíco, pero sin mencionar la capa bacilar.

Ehrenberg (1833) realiza estudios microscópicos de la retina esperando comprender a través de ella la estructura del sistema nervioso, pero no pudo dar una explicación clara de la continuidad de las fibras del nervio óptico y las células ganglionares o ("glóbulos pálidos" como las denominaba). Tampoco fue capaz de reconocer la naturaleza nerviosa de las fibras que veía y aunque describió la presencia de elementos en forma de maza en la capa bacilar, no supo interpretar su naturaleza ni relacionarlos con las fibras del nervio óptico.

Treviranus (1835) vió con claridad los conos y bastones, que llamó "Papillae". Estudió retinas de numerosos animales como pollos, cuervos, ranas y peces. Describió los elementos de la capa bacilar, presentándolos como las terminaciones nerviosas de las fibras del nervio óptico, que funcionan como fotorreceptores.

Corti (1850) muestra que los procesos de las células ganglionares se continúan con las fibras del nervio óptico. Después de este descubrimiento varios autores piensan que las células ganglionares son sensibles a la luz.

Después de la introducción del ácido crómico en las técni-



cas de laboratorio, la estructura de la retina humana y de otros vertebrados fue estudiada exhaustivamente por Pacini (1845), Bowman (1849), Kölliker (1854), Müller H. (1857). A través de estos estudios y por medio de la utilización de cortes perpendiculares de la retina teñidos con ácido crómico, se estableció la estratificación esencial de la misma. Müller H. (1851) describe las "fibras radiales", que atraviesan la retina conectando el borde superior con el inferior. El problema de la integración de las fibras del nervio óptico con otras estructuras retinianas parecía por fin solucionarse. Después de su primera conexión con las células ganglionares, y pasando a través de ellas, las fibras del nervio óptico se continúan con las fibras radiales, que atravesando las capas superiores llegan a la capa bacilar donde terminan en forma de conos y bastones. Esto supuso la evidencia de que los conos y bastones eran los órganos donde tenían lugar los procesos de fotorecepción (Kölliker y Müller 1852) (FIG. 2 B).

Esta hipótesis no fue aceptada por los seguidores de Treviranus quienes reclamaban como fotorreceptores ("papillae") el borde de la retina que está pegado al vítreo. También es contraria la hipótesis de Bidder (1839), Hannover (1854) y Brücke (1844) quienes suponían que las estructuras de la capa bacilar no eran elementos nerviosos, sino elementos calópticos, donde la fotorecepción tiene lugar.

Tras el descubrimiento por H. Müller de las fibras radiales Remak (1854) y el propio Müller notaron que tales fibras ni conectaban con las células ganglionares, ni con las fibras del nervio óptico, llegando a la conclusión de que no eran elementos nervio-

sos sino elementos de sostén de la retina (Remak 1854).

Schultze (1866), Schwalbe (1874) y Merkel (1877) estudian la retina con nuevas técnicas e intuyen que debe haber una continuidad directa entre los conos y bastones y las fibras internas nucleares y entre éstas con las del nervio óptico, pero no logran observarlo (FIG. 2 A).

Aplicando el método de Golgi a la retina entera, Tartuferi (1887) confirma que las fibras vitreales de los conos terminan en la plexiforme externa por medio de múltiples filamentos, que se relacionan con las expansiones esclerales de las células bipolares y de otras células cuyos cuerpos forman la capa nuclear interna y cuyos procesos vitreales descienden hasta la plexiforme interna donde parece que conectan con los procesos esclerales de las células ganglionares, estableciéndose una conexión continuada entre los fotorreceptores por un lado y las fibras del nervio óptico por otro (FIG. 2 C).

Erlich (1886) descubrió un nuevo método para teñir las células nerviosas, el azul de metileno, y fue Dogiel (1888-1891) quien lo aplicó a la retina obteniendo imágenes nítidas de las fibras del nervio óptico. Para Dogiel igual que para Tartuferi, los procesos de las células nerviosas se entremezclan formando un verdadero retículo.

## B) LA OBRA DE CAJAL Y SUS SEGUIDORES

Cajal (1893) comenzó el estudio de la retina para comprobar las afirmaciones de Tartuferi y de Dogiel con "experimentos con-

trolados combinando los dos métodos (cromato de plata y azul de metileno respectivamente) para completar y corregir los resultados que obtuvieron". Tartuferi y Dogiel lo mismo que los autores que estudiaron la retina inmediatamente antes de Cajal estaban profundamente influidos por la teoría reticular de Gerlach sobre la organización del sistema nervioso de tal forma que a pesar de las imágenes por ellos obtenidas "veían" anastomosis directas y puentes protoplásmicos que unían células vecinas y como consecuencia describían las células plexiformes como redes o retículos continuos (las "rete nervosa" de Golgi).

Cajal (1893) demostró que la retina estaba formada por células nerviosas individuales y sustituyó el concepto de continuidad de las fibras del nervio óptico a través de todo el espesor de la retina hasta las células visuales, que como hemos visto dominó durante todo el siglo XIX, por un concepto nuevo y revolucionario, el de cadenas de células nerviosas conectadas por "dispositivos de engranaje" (sinapsis). Los estudios de Cajal sobre la retina de los vertebrados fueron una contribución muy positiva para su principio de la neurona.

Antes de Cajal, el conocimiento de la estructura del sistema nervioso y de su fisiología era muy rudimentario. Hasta fines del siglo pasado dominó la idea de que el sistema nervioso estaba constituido por núcleos, fibras y una sustancia intercelular. A esta sustancia intercelular Rindfleisch le atribuyó un papel fundamental en el funcionamiento del sistema nervioso. Cualquier excitación que llegara por los nervios periféricos al sistema nervioso central se propagaría de una manera uniforme a través de esta

masa intercelular y de alguna forma desconocida se canalizaría a través de los nervios efectores.

Al progresar los métodos de análisis morfológicos se comprobó la existencia de numerosas fibrillas que formaban una red continua o retículo en el seno de la masa nerviosa y la función atribuida a la sustancia intercelular de Rindfleisch lo fué a este retículo dando base a lo que se conoció con el nombre de teoría reticular de Gerlach. La consecuencia fisiológica de esta concepción anatómica sería la misma que acabamos de mencionar más arriba en relación con la sustancia intercelular.

Algunos autores observaron que sus observaciones no estaban de acuerdo con esta teoría general pero hasta Cajal dicha concepción dominó la mente de todos los científicos que analizaban el sistema nervioso de forma tal que Van Geuchten (c. Tello 1935) pudo decir años más tarde "los hechos descritos por Cajal en sus primeras publicaciones resultaban tan extrañas que los histólogos de la época lo recibieron con el mayor escepticismo".

Cajal ya en 1888 en su trabajo fundamental "Estructura de los centros nerviosos de las aves" pudo afirmar que "las células nerviosas no se anastomosan directamente, es decir por sus expansiones protoplásmicas, este fenómeno que tanto contraría nuestras hipótesis fisiológicas y anatómicas... no se ha escapado a Golgi que procura explicarlo estableciendo en el seno de la sustancia gris de los centros una red de expansiones axiles que denomina red difusa 'rete nervosa' y por la que podría enlazarse la célula de un modo indirecto". Por el contrario Cajal establece claramente que : "No hemos logrado nunca ver una anastomosis entre ramifi

caciones de dos prolongaciones nerviosas distintas y tampoco entre los filamentos de una misma expansión de Deiters; las fibras se entrelazan de modo complicadísimo engendrando un plexo intrincado y tupido pero jamás una red".

Con arreglo a estos conceptos Cajal pudo analizar las conexiones que se establecían a nivel de la capa plexiforme de la retina. Sus hallazgos fundamentales se pueden resumir de la siguiente manera : descripción de los pies (cuerpos sinápticos) de las células visuales y su localización en la capa plexiforme externa. El descubrimiento de las bipolares para conos y para bastones dando con ello apoyo a la teoría de la duplicidad de Schultze, el descubrimiento de las células que previamente habían sido descritas como "basales", "estrelladas", "asteriformes", "subreticulares", "concéntricas", que eran en realidad neuronas de axón corto, y finalmente el descubrimiento de las células amacrinas carentes de cilindro eje o axón y la descripción de las fibras centrífugas en las aves así como de los diversos tipos de células ganglionares. Al describir las células basales, estrelladas, etc. las denominó células horizontales nombre con el que se conocen hoy día. Sobre la base de sus descubrimientos, Cajal diseñó esquemas de organización retiniana que han estado vigentes durante 75 años sin alteración sustancial (FIG. 3 C).

Realmente desde Cajal y hasta la introducción de la microscopía electrónica los únicos trabajos dignos de mención especialmente en la retina de los primates fueron los de Balbuena y Polyak.

Balbuena (1922; 1936) utilizando su propio método de impreg

nación argéntica y el método de Golgi logró tinciones de bipolar individual de conos cuyos penachos forman lo que parecía ser una fila continua, comprobando también la disposición escleral, con relación a los pies de los conos, de las esférulas de los bastones. Estas observaciones incompletas le llevaron a una interpretación errónea de la sinapsis a nivel de la capa plexiforme externa que sin embargo fue recogida con gran amplitud por Redslob (1939). Para Balbuena las esférulas de los bastones están en contacto con los pies sinápticos de los conos de tal forma que un cono y un grupo de bastones que le rodean formarían una unidad funcional fotorreceptora. Hasta aquí la observación de Balbuena era correcta conforme demostró 50 años más tarde la M.E. (Alvarez Manzanero, 1982). Sin embargo, el error de Balbuena fue considerar que la única vía directa visual sería la mediada por su bipolar "sinaxica" relegando a las bipolares para bastones de Cajal a la función de elementos asociativos entre bipolares "sinaxicas" próximas.

Polyak (1941) demostró que las células horizontales en la retina del mono (que Cajal no había estudiado) eran de un tipo único en vez de las dos variedades, externas e internas, descritas por Cajal en la retina de los mamíferos inferiores. Este hecho y su descripción de las bipolares, amacrinas, y células ganglionares, le llevaron a afirmar que el módulo estructural de la retina es mucho más complejo que el concebido por Ramón y Cajal (FIG. 3 A y B). A pesar de esta afirmación más de 20 años transcurrirían antes de que se obtuvieran nuevas contribuciones de importancia sobre la estructura de la retina.

Es curioso señalar que entre los estudios de Cajal, Balbue

na y Polyak, y a pesar de sus descubrimientos donde habían quedado claramente descritos los cuerpos sinápticos de los fotorreceptores (llamados por Cajal pies de conos y esférulas de bastones) así como de los penachos dendríticos de los distintos tipos de células bipolares, la confusión acerca de la estructura de esta capa llegó al absurdo, que citamos como anécdota, de la descripción por Fortin (1926;1930) de unos supuestos "aparatos dioptricos" a nivel de la capa plexiforme que según el autor argentino serían los elementos fotosensibles de la retina (FIG. 4 A y B).

Estas estructuras en realidad están formadas por el cuerpo sináptico del cono no teñido y la porción más externa del penacho dendrítico de la célula bipolar individual de conos descrita por Balbuena con el nombre de bipolar sináptica y por Polyak con el de bipolar h. Precisamente mediante el método de Balbuena se pone en evidencia claramente esta confusión (FIG. 4 C y D).

A partir de la década de los 50 la ME contribuyó a esclarecer la fina estructura de las células retinianas y también y gracias en especial al método combinado Golgi-ME a aclarar las conexiones existentes entre células visuales, bipolares y células horizontales. Otro avance considerable en el conocimiento de la estructura de la retina se logró gracias a la aplicación de las técnicas de impregnación argéntica de la retina entera, primero utilizando el método de Bielchowsky y después variantes del método de Golgi. Mediante estas técnicas se llegó al descubrimiento de nuevos elementos retinianos (células interplexiformes, células ganglionares de asociación) y en especial al de células horizontales sin axón. Más adelante estudiaremos estos descubrimientos y la im

portancia funcional que han significado. Desarrollaremos a continuación el estado actual de nuestros conocimientos sobre los fotoreceptores retinianos y en especial de las células visuales de las aves y a continuación el de las células horizontales.

### C) FOTORRECEPTORES

Schultze (1866-1867) llamó la atención acerca de las células visuales de las aves con una observación de importancia funcional : comprobó que en las aves de hábito diurno su retina era pobre en bastones mientras que en las de hábito nocturno el número de bastones era muy abundante, de esta observación dedujo que los conos serían las células visuales que intervenían en la visión fotópica mientras que los bastones lo harían en la visión escotópica. Esta teoría de la duplicidad recibió posteriormente un gran aporte morfológico al descubrir Cajal (1893) las células bipolares para conos y para bastones.

Los conos de la retina de las aves (así como la de los reptiles y anfibios) tienen un carácter morfológico ausente en los mamíferos y que es la presencia de gotas lipídicas coloreadas, descubiertas por Hannover (1840). Estas gotas lipídicas estudiadas inicialmente por Schultze, Schwalbe, Krause, Dobrowsky, Hoffman, Beauregard, permiten diferenciar conos con gota de distintos colores (filtros para distintas longitudes de onda) propiedad de un gran interés, como veremos más adelante, para el estudio de la organización funcional de la capa plexiforme externa

Cuando Cajal comenzó el estudio de la retina de las aves, prescindió del análisis de las gotas lipídicas ya que el método



de Golgi que utilizó las impregnaba en negro como el resto del protoplasma de las células visuales. Comprobó de esta forma la existencia en las gallináceas y en la paloma de bastones, conos rectos y conos dobles o gemelos, descubriendo un nuevo tipo de conos que denominó oblicuos por su disposición peculiar en la capa plexiforme externa. Por otra parte, Cajal comprobó que los cuerpos sinápticos, o pies de fotorreceptores como él los llamaba, se situaban en tres niveles distintos a nivel de la capa plexiforme externa.

Describió Cajal la localización de los distintos componentes de las células visuales en las capas retinianas y así comprobó que el núcleo de los bastones se localiza en la mitad inferior de la zona de granos externos y que su filamento vitreal, que termina por un cuerpo sináptico en forma de superficie aplastada, emitía finos filamentos horizontales. El núcleo de los conos rectos se encuentra en las gallináceas inmediatamente por debajo de la membrana limitante externa, es ovoideo y posee un fino filamento que termina por un ensanchamiento en la capa media de la plexiforme externa del que parten finos filamentos horizontales. Los cuerpos de los conos oblicuos se distinguen de los conos rectos por la terminación de la fibra descendente (vitreal), la cual es muy larga y se inclina progresivamente haciéndose en la plexiforme externa casi horizontal; su ensanchamiento basilar (pie sináptico) se localiza a nivel de la capa más interna de la plexiforme externa; a veces la fibra descendente emite colaterales durante su trayecto (FIG. 9). El pie da origen a una serie de fibrillas que se entrecruzan con las que proceden de los conos vecinos

y en algunos casos el cuerpo sináptico se encuentra localizado en plena capa de las células horizontales. Los conos gemelos o dobles están formados por pares de células visuales en íntimo contacto entre sí pero independientes, los núcleos asociados de ambos conos presentan una dimensión desigual y comprobó que el más voluminoso presentaba una foseta donde se alojaba el otro. Según Cajal las dos fibras descendentes no tienen la misma longitud, particularidad que ya había apreciado en los reptiles, con lo que cada elemento de la pareja representa un conductor individual pues la prolongación descendente reside en un plano diferente de la zona plexiforme y entra en relación con una bipolar especial.

Según Cajal (1893) la capa plexiforme externa de las gallináceas se compone de 3 pisos o plexos concéntricos : "El piso externo está formado por las fibras o fibrillas basilares de los bastones y por los penachos de ciertas bipolares; el piso medio o intermedio está constituido por las expansiones de los conos rectos y las arborizaciones ascendentes de otra especie de bipolares; el piso interno se compone de fibrillas emanadas de los conos oblicuos y de los penachos superiores que nacen de otras bipolares". Cajal hace la observación, después de describir así la estratificación de la capa plexiforme externa en la retina de las gallináceas, que "creemos que este plan de construcción puede sufrir algunas modificaciones en las diversas especies de pájaros sobre todo en aquéllos de pequeña talla". No hace ninguna referencia a la estructuración de la capa plexiforme externa en las aves de hábito nocturno.

Este concepto de la capa plexiforme externa con sus células

visuales, bipolares y células horizontales, que veremos más adelante establecido por Cajal ha permanecido en rigor por cerca de 100 años sin que se aportara ninguna nueva contribución a sus conceptos básicos.

La absorción de distintas longitudes de onda por las gotas lipídicas de los conos de las aves se ha estudiado en varias ocasiones, mencionaremos únicamente tres estudios muy representativos. El primero de ellos Raof (1929) lleva a cabo un estudio espectrofométrico en la retina de la gallina comprobando que todas las gotas dejaban pasar las longitudes de onda largas y absorbían las longitudes de onda cortas. Clasificó las gotas lipídicas en tres grupos : rojas, aquéllas que absorbían hasta 574 nm; amarillas aquéllas que absorbían hasta 512 nm y verde pálido aquéllas que absorbían hasta 455 nm.

Strother (1963) estudió las gotas lipídicas mediante microespectrofotometría en las retinas de la tortuga, el pato y la paloma. Las conclusiones a las que llegó fueron las siguientes : el máximo de absorción es de  $80 \pm 10\%$  de la luz que incide sobre ellas independientemente del color que posean, del tamaño que tenga la gota o de las especies animales estudiadas. Todas las gotas estudiadas se comportan como filtros "cut-off" es decir dejando pasar sólo una determinada zona del espectro que se corresponde con las de mayor longitud de onda y los colores de las gotas estudiadas son los siguientes : rojo, impide el paso de luz a 570 nm; naranja, impide el paso de luz a 540 nm; naranja claro, impide el paso de luz a 530 nm; verde, impide el paso de luz a 440 nm; e incoloras que impide el paso de luz a 390 nm.

No todos los colores están presentes en todas las especies: en la tortuga no se encuentran gotas verdes, en el pato y en la paloma no observó gotas incoloras.

Más recientemente, Bowmaker y Knowles (1976) identificaron los conos de la retina del pollo mediante espectrofotometría de las gotas lipídicas presentes en los segmentos internos y describieron la existencia de 6 tipos distintos y de 3 tipos de pigmentos visuales, un pigmento visual cuya longitud de onda máxima es de 506 nm correspondería a la rodopsina presente en los bastones. Estos autores denominaron a los 6 tipos de gotas, incolora, tipo A, tipo B1, tipo B2, rojas y tipo C. El tipo B está localizado en los conos dobles siendo la gota B1 la del principal y la B2 la del accesorio. Las gotas B1 se caracterizan por presentar un pico en los 485 nm de la curva de absorbancia espectral. Las gotas B2 presentan un triple pico con longitud de onda máxima cerca de los 483, 451, 425 nm. Los restantes tipos de gotas se hallan en los conos simples. Las gotas incoloras muestran no tener absorbancia al atravesar el espectro, los tipos A, C y rojos actúan como simples filtros cut-off. El tipo A presenta una longitud de onda máxima a los 554 nm, tipo C a los 520 nm, y los rojos a los 585 nm.

La ubicación de las gotas lipídicas en los fotorreceptores se estudió por Meyer y Cooper (1966) en la retina del pollo mediante microscopía electrónica y, con contraste de fase, describieron tres tipos diferentes en los fotorreceptores : bastones, conos simples y conos dobles. Los bastones se caracterizan por su segmento externo, por carecer de gota lipídica en el segmento interno y por la presencia de hiperboloide en la parte superior del

segmento interno. El cono simple contiene una gota lipídica de color rojo en su segmento interno. Los conos dobles están formados por dos elementos desiguales, uno alto y delgado que le denomina principal y otro ancho y corto que es el accesorio. El miembro principal del cono doble contiene una gota grande de color amarillo mientras que el accesorio posee una gota pequeña verde-amarillenta, el miembro accesorio se caracteriza por tener paraboloides que ocupa casi todo su segmento interno. Tanto el hiperboloide de los bastones como el paraboloides de los conos accesorios son estructuras repletas de glucógeno. Estos autores no observaron gotas incoloras en la retina del pollo y relacionaron las gotas lipídicas coloreadas con los distintos tipos de conos viendo que existían tres niveles de gotas en la retina. En el nivel más externo se encuentran las gotas rojas presentes en los conos simples, en el nivel intermedio las amarillo-verdosas situadas en los conos accesorios y en el nivel interno estaría ocupado por las gotas amarillas presentes en el cono principal de los conos dobles.

Morris (1970) describió diversos tipos de células visuales del pollo, bastones sin gota oleosa, conos dobles cuyo miembro principal tiene una gota amarilla grande y el accesorio posee una gota amarillo-verdosa pequeña así como tres tipos de conos simples. Esta autora llevó a cabo un recuento de los distintos tipos de fotorreceptores en la retina del pollo, según su trabajo en la retina central hay un 14% de bastones, un 32% de conos dobles y un 54% de conos simples. En la retina periférica se encuentran mayor número de bastones, un 33%, así como un 30% de conos dobles y un 37%

de conos sencillos. Morris clasificó a los conos simples en tres tipos, tipo 1, tipo 2 y tipo 3; la proporción entre estos tipos de conos simples es de 5-2-1 y no encuentra que exista ninguna variación en tal proporción dentro de la retina central y periférica.

Gallego y cols. (1975) estudiando la retina de 3 aves diurnas, *gallus domesticus*, *hieratus fasciatus*, *milvus milvus* y de 2 aves nocturnas, *carinae noctua* y *asio flammeus*, demostraron la estratificación en tres capas de los cuerpos sinápticos de los fotoreceptores de las aves diurnas y la ausencia de estratificación en las aves nocturnas, en ellas todos los cuerpos sinápticos terminan al mismo nivel. Según estos autores en los animales diurnos, los conos dobles poseen en el miembro principal una gota amarilla y en el accesorio hay una gota muy pequeña incolora; diferencian sólo dos tipos de conos sencillos, uno que contiene gota roja y otro que posee gota amarillo-verdosa.

Mariani y Leure-Dupree (1978) estudiando la retina de la paloma han identificado 6 tipos de fotorreceptores. El examen en fresco de las gotas lipídicas, en los segmentos internos de los conos, muestran 5 tipos diferentes, caracterizados por el color, tamaño y estratificación. Haciendo secciones perpendiculares que abarcan toda la longitud de los fotorreceptores y examinándolos, con ME, las gotas lipídicas han sido descritas no por su color si no por sus características de tamaño, y estratificación, además se pueden identificar los distintos receptores por la morfología de sus terminales. De este modo Mariani describe : bastones, que carecen de gota lipídica y su cuerpo sináptico termina en el es-

trato más externo de la plexiforme externa. Conos dobles, cuyo miembro principal posee una gota amarilla en el segmento interno y el accesorio tiene una gota pequeña incolora; los cuerpos sinápticos de los conos dobles terminan en el mismo estrato que los bastones, en la plexiforme externa, nivel más escleral. Dos tipos de conos simples rectos, uno dotado con gota roja y otro naranja; ambos tipos de conos rectos tienen sus cuerpos sinápticos en el estrato medio de la plexiforme externa. Conos simples oblicuos que poseen una gota amarillo-verdosa en su segmento interno y su terminal sináptica está situada en el estrato más interno de la plexiforme externa.

Armengol y cols. (1979) describe que los conos de la retina del pollo, poseen en la parte más superior del segmento interno una gota de inclusión lipídica, roja, verdosa o amarillo-dorada. Ultraestructuralmente se distinguen dos tipologías bien definidas, tipo I corresponde a una gota de gran tamaño cuya matriz electrolúcida posee formaciones membranosas en su interior. Este tipo de gota se ubica en los conos simples y en el miembro principal del cono doble. Los conos accesorios presentan una gota de tamaño menor, matriz homogénea, electrodensa y finamente granulada; correspondiéndose con el tipo II de gota.

Secciones semi-finas muestran la existencia de 3 niveles de ubicación de las gotas lipídicas. Las gotas de color amarillo-dorado se ubican tanto en los conos dobles (miembro principal) como en los conos oblicuos y se hallan en el estrato más escleral. En el nivel intermedio se sitúan las gotas de los conos accesorios de color amarillo-dorado y menos frecuentemente verdosa.

Cuando la gota del elemento accesorio es verdosa la gota del miembro principal posee la misma coloración. Las gotas de color rojo y verdoso se encuentran independientes, pertenecen a los conos rectos, ocupando el nivel más interno.

El color de las gotas, se debe a la dilución de uno o varios carotenoides en una matriz incolora, constituida por lípidos insaturados.



G O T A S   L I P I D I C A S

- 20 -

AUTOR	ROJAS	AMARILLAS	VERDE PALIDO	NARANJA	NARANJA CLARO	INCOLORA	CON M.E.
ROAFF (1927)	574	512	455				
STROTTRER (1963)	570		440	540	530	390	
MEYER Y COOPER (1966)	+	+	+	-	-	-	
MORRIS (1970)		+	+				I, II, III
GALLEGO Y COLS. (1975)	+	+	+	-	-	+	
GAYOSO (1975)	+	+	+	-	-	+	
BOWMAKER Y KNOWLES (1976)	585	520 485	451 425	-	-	+	
MARIANI Y COLS. (1978)	+	+	+	+		+	
GENIS (1979)	+	+	+	-	-	-	I y II

FOTORECEPTORES Y GOTAS

	BASTONES	CONO DOBLE		CONO SIMPLE	CONO RECTO	CONO OBLICUO
		PRAL.	ACCES.			
MEYER Y COOPER (66)	-	amarillo	verde-amar.	roja		
MORRIS (70)	-	amarillo	verde-amar.	I, II y III(x)		
GALLEGO Y COLS. (75)	-	amarilla	incolora		roja	amarillo-verdosa
MARIANI Y COLS. (78)	-	amarilla	incolora	naranja	roja	amarillo-verdosa
GENIS (79)	-	amarilla	amarilla		I(x)	amarilla
		I(x)	verde II (x)			

(x) sin determinación de color, con M.E.

#### D) CELULAS HORIZONTALES

Las células horizontales son unos elementos constantes en todas las retinas de vertebrados aunque presentan caracteres propios según las especies estudiadas. Están situadas a nivel de la capa plexiforme externa y, terminan siempre, tanto sus dendritas como sus terminales axónicas, cuando existen, a nivel de la misma capa, donde establecen contactos con los fotorreceptores. Desde el descubrimiento de H. Müller en 1851 hasta la descripción de Cajal diversos autores estudiaron estas células y las describieron con diversos nombres :

<u>A Ñ O</u>	<u>A U T O R</u>	<u>D E N O M I N A C I O N</u>
1851	H. MULLER	sternförmigen zellen
1874	W. MULLER	tangentialen fulcrum zellen
1881	RANVIER	cellules basales
1883	DOGIEL	sternförmigen zellen
1886	SCHIEFFERDECKER	koncentrische Stützzellen
1887	TARTUFERI	cellule superficiali
1893	CAJAL	celulas horizontales

La mayor parte de todos estos autores las consideraban como elementos de sostén o células neuroglícas, concepto que fue resumido por Schiefferdecker (1886) cuando las denominaba "koncentrische stützzellen" para distinguirlas de las fibras de Müller que serían las "radiale stützzellen".

Cajal (1893) demostró, en su estudio de la retina de los vertebrados, que este tipo celular era en realidad una neurona de axon corto y describió en los tetrapodos dos variedades, "inter-

nas" y "externas", en la retina de los mamíferos y anfibios, y "en brocha" y "estrelladas" en las retinas de las aves y reptiles. Las "externas" son células aplanadas que residen en la plexiforme externa en el estrato más superior, vistas de plano parecen estrelladas emiten gran cantidad de dendritas divergentes horizontales, describió también que poseen un axón fino que tras un trayecto horizontal se resuelve en una arborización en el espesor de la misma capa plexiforme. Las "internas", según Cajal, son corpúsculos más gruesos y profundos que los precedentes, poseen un axón robusto que discurre horizontalmente por la plexiforme externa y después de un trayecto variable acaba por debajo de los fotorreceptores.

Fue la disposición de las células horizontales en relación con los fotorreceptores lo que hizo postular a Cajal la existencia en la retina de un sistema de conexión transversal cuya función no alcanzaba a definir. El mismo decía : "difícil es saber la función de estos elementos, pero según sus conexiones cabe conjeturar que su misión es desparramar por una gran parte de la plexiforme externa el impulso visual recogido en algún lugar de la retina" (1904, II, pág. 599). En 1933 en motivo del XIV congreso internacional de oftalmología, precisa más esta hipótesis sobre la función de las células horizontales y habla de la "paradoja de las células horizontales". Explica que las células horizontales se articulan mediante finas dendritas ascendentes con las esferulas terminales de bastones y el axón, tras un trayecto variable, se resuelve en favor de una arborización tupida paralela a la plexiforme externa, articulándose con la extremidad inferior de los fo

torreceptores. "Imposible precisar con cuales entra en contacto, en todo caso ninguna neurita alcanza la zona de las fibras del nervio óptico". Se ve forzado a admitir que el impulso visual recogido por las células horizontales refluye de nuevo a los fotorreceptores de otros radios retinianos, constituyendo algo así como un "círculo vicioso". Para explicar este contrasentido, supuso que las células horizontales, no son auténticas vías visuales, si no "centros energéticos adscritos a la articulación fotorreceptores-bipolares y destinados a reforzar la densidad de la onda transmitida por la pareja bipolar-ganglionar" (1933).

Hasta Polyak (1941) no se estudian de nuevo las células horizontales. Este autor en la retina de los primates confirma que sólo existe un tipo de célula horizontal y no dos, internas y externas, según la clasificación de Cajal, cuya morfología varía se gún su localización retiniana. Cajal no estudió la retina de los primates pero extrapolo los datos obtenidos en las retinas de los mamíferos inferiores a los mismos. En los primeros esquemas de Po lyak sobre organización retiniana observamos que las conexiones que atribuye a las células horizontales son en parte correctos : por sus dendritas se conectan con los conos y por sus terminales axónicas tanto con las esférulas de los bastones como con los pies de conos (FIG. 3 B). En otro de sus esquemas, resumen de todos los datos por él obtenidos (FIG. 3 A), atribuye definitivamente conexiones de la terminal axónica tanto con conos como con bas tones. Gallego (1964) descubre un nuevo tipo de células horizontales en la retina de los mamíferos inferiores, denominándolas "células amacrinas de la plexiforme externa"; amacrinas porque este

tipo celular no posee axon. Utilizando la técnica de impregnación argéntica de la retina entera (Gallego 1953) demostró que este tipo de células forman una capa que cubre toda la retina incluida el área centralis, desde la ora serrata hasta la papila (Gallego 1964, 1965, 1971). En los mamíferos inferiores estas células tienen morfología ligeramente diferente según las especies estudiadas. Con microscopía óptica puede comprobarse que el núcleo de estas células está situado en la fila más externa de núcleos de la capa de granos internos, son pobres en cromatina y tienen un núcleo bien organizado. El cuerpo celular es pequeño pero está provisto de gruesas expansiones que se dividen en ramas cada vez más finas, se distribuyen en un plano horizontal, perpendicular a la vía centripeta y constituyen un plexo bien definido formado por el entrecruzamiento de sus expansiones. De los gruesos procesos celulares salen directamente unas ramitas colaterales que se dirigen a los pies de los fotorreceptores. Estas ramitas terminan en varicosidades a veces única o bien dispuestas en pequeños ramilletes (FIG. 5). Estas células horizontales se colorean muy bien con el método de Cajal nitrato de plata reducido, con el de Balbuena y con el de Gross-Bielchowsky.

Dowling y cols. (1966) utilizando el método de Golgi comprobaron la existencia de este tipo celular sin axon en retinas de gato y conejo, hallazgo confirmado a continuación por Leicester y Stone (1967) y por Fisher y Boycott (1974).

La identificación de este tipo celular sin axon con M.E. en retinas de gato y conejo, así como el tipo de conexiones que establecen con los fotorreceptores, ha sido llevado a cabo por Sobri-

no y Gallego (1970), Gallego (1971) y especialmente por Kolb (1974), determinando que las expansiones celulares penetran en el complejo sináptico de los conos, estableciendo además abundantes gap-junctions entre ellas, lo que sugiere un acoplamiento eléctrico.

Recogiendo la información existente, Gallego (1976) llega a la conclusión que en la retina de los tetrapodos existen dos tipos básicos de células horizontales que establecen conexiones transversales entre los complejos sinápticos de los fotorreceptores y que tanto funcional como morfológicamente son claramente diferentes : a) Células horizontales de axon corto (Cajal 1893) y

b) Células horizontales sin axon (Gallego 1964).

Las células horizontales de axon corto son las clásicas células descritas por Cajal (1893) y características de la retina de los tetrapodos. Sus dendritas forman el componente lateral de las triadas de conos y sus terminales axónicas penetran en el complejo sináptico de los bastones según se demostró en los mamíferos (Kolb 1970, 1974); (Gallego y Sobrino 1975) y en las aves (Gallego y cols. 1975 b). Al parecer todas las retinas estudiadas hasta ahora presentan un solo tipo de célula horizontal con axon, excepto en los primates que aparecen dos tipos celulares con axon (Gallego 1978). La célula horizontal sin axon en la retina de los mamíferos (Gallego 1964), y en la retina de los reptiles (Gallego y Pérez-Arroyo 1976) se diferencia funcionalmente de la célula de axon corto, en que las expansiones celulares se introducen en el complejo sináptico de las triadas de conos exclusivamente (Kolb 1974).

Estos dos tipos de conexiones entre fotorreceptores y células horizontales sugieren la existencia de dos sistemas de organización a nivel de la primera sinapsis de la vía visual :

- 1.- Interacción entre conos y bastones mediante las células horizontales de axon corto.
- 2.- Interacción entre un mismo tipo de fotorreceptor (los conos en los tetrapodos) mediante las células horizontales sin axon.

#### CELULAS HORIZONTALES DE LAS AVES

La primera descripción de las células horizontales de la retina de las aves, como neuronas de axon corto, fue realizada por Cajal (1888, 1893) quien distinguió en la retina del gorrión dos tipos estructuralmente diferentes : células en "brocha" y células "estrelladas".

Las células en brocha según la descripción de Cajal, presentan dendritas cortas y abundantes, dirigidas hacia los cuerpos sinápticos de las células visuales en forma de una apretada brocha, cuyos últimos filamentos alcanzan la fila más externa de la plexiforme externa; el axon tiene una longitud de 300 a 400 micras y termina en una estructura aplastada cuyas ramas ofrecen el aspecto de espinas divergentes dirigidas hacia los cuerpos sinápticos de los fotorreceptores. Según Cajal estas placas arborizadas se sitúan inmediatamente por debajo de los pies de los conos rectos.

Las células "estrelladas", están provistas de procesos celulares (dendritas) más largos y dispersos que las células anteriores que se terminan en la porción más elevada de la plexiforme externa. Cajal no pudo determinar la terminación del axon que



lo describe haciendo el único comentario que éste no emite ninguna colateral durante su trayecto.

Esta descripción de Cajal sobre las células horizontales de las aves, ha sido admitida sin discusión hasta 1975 cuando Gallego y cols., demostraron que tanto en las aves diurnas como nocturnas sólo existe un tipo de célula horizontal con axon, la célula en "brocha" de Cajal, y que la célula "estrellada" de este autor no era una célula sino la gruesa terminal axónica de la célula en "brocha".

Como sucedió a partir de 1964 en la retina de los mamíferos se encontraron también en la retina de las aves células horizontales sin axon pero a diferencia de lo que ocurre en aquéllos, han podido ser descritos dos tipos morfológicamente diferentes y también con distintas conexiones con los fotorreceptores. Gallego (1977) descubrió una célula "estrellada" en la retina del pollo, que fue descrita independientemente por Mariani y cols. (1977) en la retina de la paloma; Genis (1979) confirma la existencia de esta célula sin axon en la retina del pollo. Por otra parte Gallego (1977-1978) describe otro tipo de célula horizontal sin axon, que inicialmente la denominó "bipenachada". Un tipo análogo fue descrito por Genis-Gálvez y cols. (1979) denominándolo célula "en candelabro".

En los trabajo de Cajal no quedan establecidas las conexiones de las células horizontales con los fotorreceptores, ni siquiera en la forma un tanto ambigua que las describió en los mamíferos. Sin embargo la estratificación de la capa plexiforme externa en tres niveles de terminación de los cuerpos sinápticos

de los conos ayuda considerablemente en las aves diurnas al estudio de las conexiones de las células horizontales de axon corto (en brocha de Cajal). Esta célula según Gallego y cols. (1975 b) por sus dendritas establece contactos con los conos de la primera fila, es decir conos dobles y quizá simples de la primera fila, y probablemente con los conos rectos y oblicuos. Las conexiones que establece la terminal axónica de esta célula pudieron ser demostradas con mayor facilidad en una retina rica en bastones como la de las aves nocturnas, con los que las ramitas ascendentes de dicha terminal establecen contacto sináptico. La célula estrellada de Gallego, según este autor, establece contacto con los cuerpos sinápticos de los conos rectos.

Gallego supone también que la célula horizontal "bipenachada" establece contacto con los conos de la primera fila, conos dobles y quizás conos simples (Gallego 1978).

El descubrimiento de las células horizontales sin axon y el estudio detallado realizado por los autores mencionados fue debido a técnicas de impregnación argéntica de la retina entera especialmente con el método de Golgi que presenta la ventaja sobre las secciones perpendiculares, obtenidas por Cajal con su técnica del "enrollamiento" de poder observar células enteras y estudiar su distribución topográfica en la retina.

En la retina de las aves nocturnas, no se observa la estratificación en tres niveles de la plexiforme externa. Según las comprobaciones de Gallego y cols. (1975) los fotorreceptores terminan todos al mismo nivel, no existen conos oblicuos ni conos rectos rojos. Sólo se han descrito conos dobles, conos simples y bastones.

## OBJETIVOS

La retina de las aves no ha sido prácticamente utilizada en estudios electrofisiológicos, de registro con microelectrodos e identificación ulterior con colorantes intracelulares. Estos estudios se están llevando a cabo en la retina de los teleosteos, reptiles, especialmente tortuga, y algunos mamíferos, en particular gato y conejo.

Sin embargo presenta la indudable ventaja de poder llegar a establecer las conexiones, a nivel de la capa plexiforme externa, que establecen los distintos tipos de conos, identificables por sus gotas coloreadas, con los diferentes tipos de células horizontales y bipolares. Ello permitiría una interpretación correcta de las respuestas eléctricas de células horizontales ante estímulos de distinta longitud de onda y con ello del mecanismo de codificación de las señales originadas en los fotorreceptores.

El objetivo de esta tesis es precisar los tipos de fotorreceptores de las aves, identificando las gotas coloreadas que contienen cada uno, los tipos de células horizontales que poseen y sus conexiones con ellos, para lo cual aparte del estudio de retinas de animales adultos hemos considerado de interés el analizar el desarrollo en el embrión, de los fotorreceptores y especialmente de las células horizontales, estudio no realizado hasta ahora.

## MATERIAL Y METODOS

### A) MATERIAL

Hemos utilizado gran número de retinas de pollo "gallus domesticus". Una serie de estudios se llevaron a cabo en embriones desde el tercer día de incubación hasta el día 21, también empleamos retinas de animales recién nacidos, un mes de edad y adultos.

Han sido observadas retinas de falcónidos, proporcionadas por ICONA, procedentes de sus reservas de aves rapaces. Los animales estudiados han sido 9 cernícalos "Falco Tinunculus"; 5 aguilas ratoneras "Buteo Buteo"; 3 milanos "Milvus migrans"; 2 aguilas calzadas "Hieratus pennatus"; 2 aguilas reales "Aguila Chysaetus".

Para el estudio de las aves nocturnas, hemos utilizado retinas de mochuelo "Carinae Noctua" y retinas de lechuza "Asio Flammeus".

Hemos empleado retinas de paloma "Columbigallina Passerina", en especial para el estudio del área roja.

A fines comparativos hemos revisado preparaciones de retinas de tetrapodos y peces existentes en el laboratorio.

### OBTENCION DE LAS RETINAS

Previo anestesia con éter, los animales eran sacrificados y los ojos enucleados. Las retinas se extraían lo más rápidamente

- 32 -

te posible y eran sumergidas en cada fijador según se describe en las técnicas correspondientes.

## B) MÉTODOS

### MÉTODO DE GOLGI COLONNIER

Un gran número de retinas fueron procesadas por este método. Se enuclean los ojos y se separa la cámara anterior de la posterior, a continuación se separa rápidamente la esclerótica del resto de ténicas oculares y con ayuda de unas pinzas finas y bajo control de una lupa binocular procedemos a separar la coroides de la retina. Se sumerge la retina en la mezcla fijadora y se limpian con un pincel de pelo de marta los restos de humor vítreo. Se dan tres cortes radiales en la retina para que pierda su concavidad, mantenida plana, entre dos papeles de filtro atados con un hilo fino, se sumerge en el fijador.

Fijador : - Dicromato potásico al 3% ..... 88 ml.  
          - Glutaraldehído al 25% ..... 12 ml.

En este fijador permanecerá 7 días. A continuación se realiza un lavado con nitrato de plata al 0,75%, hasta que no queden restos de fijador, luego se sumerge la retina en una nueva solución de nitrato de plata al 0,75% donde permanecerá como mínimo 7 días pudiendo llegar hasta 3 meses. Una vez extraídas las piezas de la plata se quitan los papeles de filtro y se pincelan cuidadosamente las retinas para quitar los precipitados. Posteriormente se deshidratan en alcoholes sucesivos pasándolas luego al carbolxilol para ser montadas con bálsamo DPX.

#### COLORACION VITAL CON AZUL DE METILENO

Hemos utilizado para la coloración vital con azul de metileno la siguiente técnica : una vez separada la retina, como hemos descrito en la técnica de Golgi-Colonnier, la sumergimos en una cámara de perfusión donde es perfundida con una solución de azul de metileno al 0,1/000, que se mantiene oxigenada burbujando carbógeno. Logramos excelentes resultados entre media y una hora de perfusión. Una vez que bajo observación con la lupa binocular se ve que la retina está teñida, se pasa al molibdato amónico al 10% muy frío durante una hora. A continuación se realiza un lavado cuidadoso con agua helada durante 10 a 15 min.

Deshidratación en alcohol absoluto muy frío.

Después se sumerge la retina en una mezcla de alcohol absoluto y aceite de cedro durante unos minutos. Se pasa al aceite de cedro puro hasta que la pieza quede transparente lo que ocurre en 1 o 2 min., se cambia a una solución de aceite de cedro 40% y toluol 60% donde permanecerá unos minutos luego lavar varias veces para eliminar los restos de aceite de cedro y se termina montando en bálsamo DPX.

#### METODO DE DIGESTION ENZIMATICA

Se ha realizado este método de digestión enzimática en retinas de pollo, embriones y palomas.

El enzima que utilizamos es una proteasa obtenida por fermentación del Actinomyces y valorada en unidades ANSON, utilizamos una solución con 10.000 U.A./ml.

Se enuclean los ojos y se sumergen en una solución de saca

rosa al 6%, mientras se separa la retina del resto de membranas oculares. Se deja la retina totalmente aislada y limpia de restos de vítreo.

Se prepara una solución de proteasa 0,5 ml. en sacarosa al 6% (0,5 ml.), en un tubo de ensayo, a continuación se sumerge la retina en esta solución. La actividad proteolítica de la proteasa se desarrolla mejor a una temperatura de 37° por lo que se debe observar cada 10 min. el grado de digestión. Cuando se quiera frenar la digestión se añaden 3 ó 4 gotas de ácido acético diluido. El sobrenadante que queda se pipetea, se coloca en un porta y se examina sin tefir, con contraste de fase u óptica de Nomarsky, o bien se tiñe, normalmente añadimos 1 ó 2 gotas de negro palatino diluido o cualquier colorante vital. Se coloca un cubreobjetos y bordeándolo con parafina fundida se observa al microscopio. Al no estar fijadas dichas preparaciones sólo duran 24 horas.

Con este método hemos obtenido imágenes de fotorreceptores aislados, conservando todas sus estructuras, incluso las gotas lipídicas de los conos con lo cual la identificación de los distintos tipos de conos se puede resolver perfectamente.



#### METODO RAPIDO DE GOLGI

Las retinas enrolladas formando un bloque, según la técnica de Cajal, son colocadas en la mezcla siguiente, de 1 a 3 días :

- Dicromato potásico al 3% ..... 20 ml.
- Osmio al 1% ..... 6 ml.

Es preferible dejar las piezas en la oscuridad y la temperatura más favorable es de 20 a 26°.

Lavado de las piezas en nitrato de plata al 0,75%. Inmersión en abundante cantidad de nitrato de plata al 0,75%. En este baño argéntico permanecerá de 36 a 48 horas.

Al extraer las piezas del nitrato de plata, se deshidratan en alcohol fuerte (96°) durante 20 min. Se seca la pieza superficialmente con un papel de filtro y se fija en un bloque de parafina.

Se procede a cortar el bloque de parafina y los cortes son recogidos en el porta empapado en alcohol de 96°, reunidos los suficientes cortes son deshidratados con alcohol absoluto, aclarados con esencia de clavo, tratados con xilol para quitar los restos de esencia de clavo. Se recubren los cortes con sucesivas capas de bálsamo del Canadá o una solución diluida de resina de Damnar.

## METODO DE BALBUENA

### 1. Técnica

Enrollamiento de la retina por el procedimiento de Cajal. Si se trata de animales pequeños el bloque resultante del enrollamiento lo dejamos unido por el nervio óptico, a un casquete del globo ocular. Cuando queremos estudiar preferentemente la capa de conos y bastones es preferible dejar la retina unida a la coroides y esclerótica, operar sobre pequeños fragmentos del globo ocular.

### 2. Fijación de los bloques

- Alcohol absoluto ..... 50 ml.
- Piridina ..... 5 a 10 ml.

Los bloques permanecen en el fijador 12, 24, 48 horas, según el espesor de las piezas. Después de fijadas se lavan varias veces en alcohol absoluto y se incluyen en celoidina y montadas en corcho se sumergen en alcohol al 70%, donde se verifica la sensibilización de las piezas.

### 3. Sensibilización de las piezas

Los bloques montados en corcho deben permanecer en alcohol al 70% desde varios días a 2 ó 3 meses. Los mejores resultados suelen obtenerse dentro del primer mes. Cuando el alcohol ha adquirido color amarillo, por la disolución de materias procedentes del corcho, la sensibilización del bloque es más rápida. Se procede a cortar el bloque con el microtomo de deslizamiento.

#### 4. Impregnación de los cortes con nitrato de plata

Los cortes son recogidos con un pincel, se depositan en el fondo de una cápsula de Petri y se vierte sobre ellos 5 ml. o más de la solución argéntica al 1/2000 a la cual añadimos unas gotas de piridina (5 ó 6 para 20 ml.). En ocasiones recurrimos a disoluciones más fuertes (1% y en otras hemos hecho la impregnación en una solución alcohólica de plata). Una vez empapados los cortes, calentamos suavemente la solución hasta que se inicie el desprendimiento de vapor y entonces dejamos enfriar. Los cortes se deben colorear en amarillo, de ordinario con 3 a 10 min. Se obtienen buenos resultados.

#### 5. Preparación del medio coloidal y revelado de los cortes

3 ó 4 gotas de succino (tintura alcohólica de ámbar amarillo) añadidas al baño argéntico dan a la solución carácter coloidal, seguidamente se añaden 2 ó 3 gotas de la solución de hidroquinona al 1% moviendo la cubeta para hacer homogénea la mezcla, cuando la reacción es favorable se observa el oscurecimiento de los cortes. El tiempo de permanencia en el revelador es variable de 4 a 10 min.

#### 6. Virado y fijación

Una vez revelados los cortes, se lavan en la misma cápsula con agua destilada y seguidamente vertimos sobre ellos una solución de bórax (borato sódico) al 1% y 3 ó 4 gotas de una solución de cloruro de oro al 1%. El virado suele ser cuestión de pocos minutos.

- 39 -

Terminamos con la fijación en hiposulfito sódico al 5%,  
lavando los cortes, deshidratación, aclaramiento en creosota y  
montaje en bálsamo.

METODO DE IMPREGNACION ARGENTICA DE LA RETINA ENTERA GALLEGO 1953

Los ojos enucleados se fijan en formol al 20%. Se realiza un pequeño corte por la ora serrata para que penetre el fijador. Permanecerá en el fijador como mínimo 15 días.

Después de fijada la pieza se procede a separar la retina de la coroides y esclerótica, para ello se practica un corte crucial en la pieza que queda dividida en cuatro segmentos, de forma que al extender posteriormente la retina adopta la forma de una cruz de Malta. Todas estas operaciones conviene llevarlas a cabo con la pieza sumergida en agua destilada.

Comprobar que la retina esté libre de restos de humor vítreo y empezar la impregnación en las siguientes etapas :

1. Lavado en agua destilada diez minutos.
2. Inmersión en nitrato de plata al 20% durante 10/15 m.
3. Inmersión en formol neutro al 20% en agua corriente debe cambiarse el formol repetidas veces hasta que ce se el desprendimiento de nubes blancas. Con retinas grandes esta operación dura habitualmente 1 hora.
4. Inmersión de la retina en plata amoniacal, si se tñe muy rápidamente añadir unas gotas de amoniaco. Seguir la coloración con el microscopio óptico.
5. Mezclar 8 partes de agua con 2 de amoniaco y sumergir la retina durante 1 minuto.
6. Pasarla a agua destilada con unas gotas de ácido acético para frenar la tinción.

7. Lavado cuidadoso en agua destilada.
8. Pasarla a hiposulfito sódico al 5% durante 3/4 minutos.
9. Lavado muy prolongado en agua corriente, por lo menos durante 2 ó 3 horas.
10. Ultimo lavado en agua destilada.

Deshidratación muy lenta, para que <sup>a</sup> la retina no se retraiga, empezando con alcoholes bajos, de 50%, de 70%, de 96%, alcohol absoluto, carbol-xilol y montaje con bálsamo DPX.

METODO DE GOLGI-STENSAAS

Este método lo hemos empleado exclusivamente en embriones de pollo. Se enuclean los ojos y se introducen enteros en la mezcla fijadora :

- Dicromato potásico ..... 5 gr.
- Hidrato de cloral ..... 5 gr.
- Formol puro ..... 5 ml.
- Glutaraldehído puro al 25% 5 ml.
- Dimetil sulfoxido ..... 5 gotas
- Agua destilada ..... 100 ml.

En este fijador permanecen dos días, al cabo de los cuales se cambia a nuevo fijador donde permanecerá otro día.

Se lavan con agua corriente hasta que no quede ningún resto de fijador, luego se realizan lavados sucesivos con solución de nitrato de plata al 0,75%. Se dejan en nueva solución de nitrato de plata al 0,75% durante 4 ó 5 días. Se limpian bien con agua destilada.

Deshidratación muy lenta empezando por alcohol al 25%, alcohol al 50%, alcohol al 70%, alcohol al 96%, alcohol absoluto y alcohol éter.

Inclusión en celoidina, empezando por celoidina al 5%, celoidina al 10% y celoidina al 20%. Se hace un bloque y se sumerge en cloroformo conservándolo en la nevera, donde permanecerá como mínimo 7 días, para que se endurezca.

Se corta el bloque con un microtomo de deslizamiento obteniendo cortes de 60 micras.

## METODOS DE MICROSCOPIA ELECTRONICA

### 1. Obtención de las piezas

Los ojos fueron enucleados con gran rapidez, separando a continuación la cámara anterior de la posterior.

### 2. Fijación

El polo posterior del ojo incluyendo esclerótica, coroides y retina es introducido en la mezcla fijadora.

Fijador : - Glutaraldehido 25% ..... 12 ml.  
- Buffer fosfato 0,2 M ..... 50 ml.  
- Agua destilada hasta ..... 100 ml.

En esta solución se separa la retina de la esclerótica y coroides.

### 3. Lavado

Se efectúa en una solución de sacarosa 0,3 M en buffer fosfato 0,1 M. El tiempo de lavado varía de acuerdo con el tiempo de fijación, si se ha fijado durante 4 horas es suficiente dos cambios, si ha permanecido 24 horas en el fijador será necesario 1 hora de lavado.

### 4. Refijación y coloración

Se introducen las piezas en una solución de osmio al 1,5% o al 2% en buffer fosfato 0,1 M, durante 2 horas, posteriormente se lavan en agua destilada (dos pases rápidos en el mismo frasco donde se hizo la coloración y fijación).



#### 5. Contraste

Las piezas se contrastan durante dos horas con acetato de uranilo al 2%, disuelto en agua destilada.

#### 6. Inclusión

Una vez contrastada la pieza, se pasa por alcoholes sucesivos para conseguir su deshidratación :

- alcohol 50% ..... 10 min.
- alcohol 70% ..... 10 min.
- alcohol 80% ..... 10 min.
- alcohol 96% ..... 20 min.
- alcohol absoluto ... 60 min. cambiándolo cada 10 min.
- óxido de propileno .. 5 min.
- óxido de propileno .. 5 min.
- óxido de propileno .. 5 min.

Terminados todos estos pases, se introduce la pieza en una mezcla de óxido de propileno y epon a partes iguales, permaneciendo en ella toda la noche. Dejando el frasco destapado a temperatura ambiente para que se evapore el propileno y quede sólo epon, permitiéndonos a la mañana siguiente el paso directo a las cápsulas con el epon nuevo.

#### PREPARACION DEL EPON

- Mezcla A ..... Epon 31 ml.  
Plastificado DDSA 50 ml.
- Mezcla B ..... Epon 50 ml.  
Endurecedor NMA 45 ml.

Las dos mezclas se conservan en la nevera a 4°C. Para hacer la mezcla final se sacan de la nevera y sin destapar los frascos se dejan a temperatura ambiente para hacer la mezcla final :

- Mezcla A ..... 10 ml.
- Mezcla B ..... 20 ml.
- DMP acelerador ... 0,47 ml.

La mezcla se agita con un agitador durante dos horas.

Terminada la inclusión las piezas eran cortadas con el microtomo y depositadas en las rejillas para ser contrastadas con el método de Reynolds.

#### 7. Contraste con el método del citrato de plomo o de Reynolds

Se mezclan los siguientes ingredientes :

- nitrato de plomo ..... 1,33 gr.
- citrato sódico con dos moléculas de agua .. 1,76 gr.
- agua destilada y hervida ..... 30 ml.

Agitar fuertemente durante un minuto y menos intensamente durante 30 min., después de los cuales añadir 8 ml. de hidróxido sódico 1 N. Se diluye todo hasta 50 ml. con agua destilada y hervida, obteniéndose una solución de  $\text{ph } 12 \pm 0,1$ .

METODO DE GOLGI-M.E.

Se selecciona una buena preparación teñida con la técnica de Golgi-Colonnier, se desmonta ésta con xilol hasta que pierda todo el bálsamo, y luego se pasa por alcohol absoluto y óxido de propileno, en cambios sucesivos durante 15 ó 20 min.

En un molde relleno de Epon se sumerge el fragmento de retina elegido, procurando que quede plano. El molde se mete en la estufa durante 3 ó 4 días, hasta que solidifique. Una vez el molde esté sólido, se procede a cortarlo en un microtomo de deslizamiento, realizando cortes de 80 micras; éstos se montan en portas de plástico, se cubren con Epon líquido y se coloca otro porta de plástico encima, se meten en la estufa durante 2 ó 3 días. Cuando el Epon haya solidificado, se levanta el porta que hace de cubre, se elige la célula y se procede a aislarla. Una vez aislada se vuelve a incluir en Epon dentro de unos moldes específicos para M.E. La célula incluida se corta con el ultramicrotomo obteniendo cortes de 600 A<sup>0</sup>, que se tiñen con el método de Reynolds.

## RESULTADOS

### A) FOTORRECEPTORES

#### I - INTRODUCCION

El estudio de las células visuales ha sido realizado por varios procedimientos : en retinas sin fijar vistas de plano, para determinar los tipos de gotas coloreadas que contienen; por aislamiento enzimático y estudio individual de las células, para la identificación de los tipos de fotorreceptores y gotas lipídicas que contienen cada uno de ellos; mediante el método de Golgi y microscopia electrónica, para realizar el estudio morfológico. Se ha estudiado también el desarrollo de los fotorreceptores en el embrión de pollo, mediante el método de Golgi-Stensaas y aislamiento enzimático.

#### 1. Gotas lipídicas y su distribución

En retinas enteras estudiadas en fresco (FIG. 6), vistas de plano se detecta la aparición de las gotas lipídicas, primero muy pequeñas e incoloras el día 13 de incubación. Son claramente evidentes y de mayor tamaño el día 14 de incubación, pero siguen incoloras. Entre los días 15 y 16 aparecen las gotas coloreadas y los tres colores, rojo, verde y amarillo aparecen simultáneamente. Del día 16 al 21 de incubación vemos como las gotas van creciendo en tamaño y en número.

En la retina de pollo de un mes, la distribución de gotas

coloreadas ha sido la siguiente, en nuestros estudios : 22% de gotas rojas, 24% de gotas amarillas y 54% de gotas verdes, habiendo contado 4796 receptores. Hemos observado que en la retina del pollo no existe fovea, tampoco vemos el "área roja" descrita en la retina de la paloma, que corresponde a la región dorso temporal, y en la cual Mariani y cols. (1978) han descrito un mayor número de gotas rojas. Nuestras observaciones indican que la coloración difusa rosada de la región dorso temporal de la retina de la paloma no se debe a la presencia de un mayor número de gotas rojas sino a que los conos rojos en esta región contienen múltiples microgotas a lo largo de su segmento interno. En la retina del pollo no observamos diferencia en la distribución de gotas coloreadas de una región a otra.

En el mochuelo hemos estudiado retinas en fresco y vistas de plano, observando que poseen menos gotas lipídicas que las retinas de las aves diurnas. No se ven gotas rojas y hay muy pocas amarillas, la mayoría son incoloras o verdosas. El número de retinas estudiadas fue muy pequeño por lo que sólo pudimos obtener estos datos cualitativos.

No hemos realizado estudios de retina en fesco en los falconidos, dada la dificultad para obtener estos animales, hemos creído más interesante utilizar las retinas de que disponíamos para estudios de observación con microscopia óptica y electrónica. Por esta razón no tenemos datos sobre la distribución de fotorreceptores en estas aves.

## 2. Tipos de fotorreceptores

La técnica de digestión enzimática nos ha permitido comprobar la presencia de los distintos tipos de células visuales que habían sido descritos, en cortes de retina, con microscopia óptica y diversas técnicas de coloración, esto es : bastones, conos dobles y conos simples : rectos y oblicuos (FIG. 7).

Esta técnica ha sido de un valor inestimable para establecer, objetiva y firmemente, la correspondencia entre los distintos tipos de conos y el color de la gota lipídica que contienen (FIG. 8). Como detallaremos en cada caso el miembro principal del cono doble posee una gota verdosa y el miembro accesorio una pequeña gota incolora o verdosa. El cono oblicuo posee una gota del mismo tipo, verdosa y encontramos dos tipos de conos rectos, uno con gota amarilla y otro roja hallazgo éste de un gran interés y que modifica, como veremos más adelante, conocimientos acerca de este tema que se daban por firmemente establecidos.

## 3. Terminación de los cuerpos sinápticos a nivel de la plexiforme externa

Mediante el método de Golgi (FIG. 9) y la microscopia electrónica (FIG. 10 y 11) hemos estudiado la estratificación de los cuerpos sinápticos a nivel de la capa plexiforme externa descrita por Cajal (1893) en las gallináceas. Corroborando los estudios de Gallego y cols. (1975) hemos podido confirmar que en la retina del pollo y los falcónidos la plexiforme externa se halla estratificada en tres niveles, ocupando el nivel externo los

cuerpos sinápticos de los bastones y conos dobles, dotados ambos, accesorio y principal con una gota verdosa y no amarilla como se había descrito por los autores anteriores. El nivel medio está formado por los cuerpos sinápticos de los conos rectos que poseen gota roja y el nivel interno está constituido por los cuerpos sinápticos de los conos oblicuos, los cuales poseen una gota verde.

Dado que el mochuelo estudiado por Gallego y cols. (1975) no es un ave de hábito puramente nocturno, hemos creído necesario estudiar la retina de la lechuza comprobando la monoestratificación de la capa plexiforme externa por lo que podemos confirmar esta especial distribución de los cuerpos sinápticos de los fotorreceptores en las aves nocturnas (FIG. 11).

## II - BASTONES

En las aves diurnas hay gran escasez de bastones, sin embargo, en las aves nocturnas los bastones son muy abundantes, al igual que en los mamíferos.

El método de Golgi, al darnos imágenes de contornos celulares, no es el mejor método para estudiar los caracteres diferenciales de los fotorreceptores, hasta el punto de que a veces es difícil diferenciar los bastones de algún tipo de cono, en especial los conos dobles cuando se tiñen de forma aislada (FIG. 12). Cuando se estudian los fotorreceptores aislados mediante la técnica de digestión enzimática no existe posibilidad de confusión. El bastón tiene su núcleo en el tercio inferior de la capa de granos externos y de él y casi sin solución de continuidad se forma el cuerpo sináptico del que parten los filamentos basales descritos por Cajal. Es característico de los bastones que desde el núcleo hasta el segmento externo forman a modo de un cilindro sin presentar los engrosamientos evidentes, que corresponden al elipsoide de los conos y al paraboloides en el cono accesorio. Su segmento externo es muy ancho y regular en las aves nocturnas siendo mucho más delgado en las diurnas. Este hecho es fácilmente demostrable con microscopía electrónica.

Con M.E. los bastones son fácilmente identificados, por su morfología y por la terminación de su cuerpo sináptico en el estrato superior de la capa plexiforme externa, diferenciándose de los conos por carecer de gota lipídica y por la estructura de su segmento externo. Son mucho más delgados que los conos, tanto su segmento externo como el interno. Tienen el núcleo redondeado si



tuado en el tercio inferior de la capa de granos externos. Por su polo inferior se continúa prácticamente por el cuerpo sináptico, el cual se caracteriza por no presentar más que uno o a lo sumo dos complejos sinápticos en contraste con los abundantes complejos sinápticos de los conos (FIG. 11 y 12).

El segmento externo de los bastones está formado por una pila de discos o sáculos enfundados en la membrana plasmática (FIG. 13). Los discos están colocados perpendicularmente al eje mayor del bastón y en esta dirección los atraviesa la luz. Los sáculos se forman por la invaginación de la membrana plasmática del segmento externo. Según esto los discos mantienen su comunicación con el exterior, pero esto sólo se aprecia en la base del segmento externo ya que luego los discos se van independizando, pierden su comunicación con el exterior y quedan totalmente aislados; a diferencia de los conos donde los discos quedan en contacto con el exterior por un lado. Como los bastones carecen de gota lipídica, lo primero que nos aparece en el segmento interno (FIG. 7) es el elipsoide formado por mitocondrias mucho más alargadas que las mitocondrias de los conos. El elipsoide se continúa con un retículo endoplásmico desorganizado. El citoplasma es más oscuro que el de los conos debido a la gran cantidad de polirribosomas libres. Por debajo de la limitante externa aparece el aparato de Golgi, éste se sitúa muy vitrealmente comparado con los otros receptores, luego se continúa con retículo endoplásmico organizado, que forma membranas paralelas repletas de acúmulos de ribosomas. Inmediatamente por debajo del retículo endoplásmico aparece el núcleo, éste ocupa la porción inferior del recep-

tor, tiene forma redondeada y está repleto de acúmulos de cromatina, es por tanto un núcleo denso. Se continúa con el cuerpo sináptico cuya característica principal es no presentar más que uno a lo sumo dos complejos sinápticos y terminar en el nivel más superior de la capa plexiforme externa, al mismo nivel donde terminan los conos dobles. Poseen también filamentos basilares largos y estrechos dirigidos hacia el estrato medio de la plexiforme externa (FIG. 9).

### III - CONOS DOBLES

#### 1. Aves diurnas

El estudio de los fotorreceptores, con microscopia de luz y métodos de tinción convencionales, da una información incompleta y a veces errónea. Igualmente es difícil precisar el tipo de gota lipídica que contiene el cono principal y si el cono accesorio tiene o no gota lipídica lo que explica las contradicciones que aparecen en la literatura referentes a estos puntos.

Sin embargo la microscopia de luz aplicada al estudio de fotorreceptores aislados por el método de digestión enzimática nos ha dado información muy interesante, que no se había podido obtener con la M.E. En el pollo las imágenes obtenidas de conos dobles (FIG. 8) muestran inequívocamente que los cuerpos sinápticos de los dos componentes, principal y accesorio, se sitúan al mismo nivel, y por otra parte demuestran también que la gota lipídica del cono principal es de color verdoso y la presencia de una gota lipídica incolora o verdosa en el cono accesorio. El cono principal muestra un núcleo situado en la mitad inferior de la capa de granos externos (FIG. 8 y 12) que se continúa con un cuerpo sináptico ancho provisto de numerosos filamentos basales. El cono accesorio posee un núcleo situado inmediatamente por debajo de la capa limitante externa, lo que se detecta en las células aisladas porque presentan a este nivel (FIG. 8 y 12) un ligero engrosamiento. Está situado pues en la zona más externa de la capa de granos externos y se continúa por una fina expansión, a forma de filamento en cuyo extremo se engrosa formando el cuer-

po sináptico, redondeado, provisto igualmente de filamentos basiales. En las preparaciones de conos dobles aislados y en especial cuando se obtienen los conos principal y accesorio, también aislados se aprecia la depresión en el cono principal que alberga el segmento interno del accesorio (FIG. 8 y 12).

El método de Golgi, en cambio, es fuente en este caso de erróneas interpretaciones, ya que es poco frecuente con este método que se tñan simultáneamente los dos componentes del cono doble y cuando esto sucede es muy difícil interpretar la imagen obtenida (FIG. 12) y por otra parte, la tinción por separado de los conos principal y accesorio, puede dar lugar a la confusión de estos elementos con conos simples.

La M.E. da una información muy completa referente a la fina estructura y disposición de los conos dobles, si bien no ha servido para resolver el problema del tipo de gota lipídica coloreada que contiene, resuelto con el estudio de los conos dobles aislados. Con M.E. son fácilmente identificables los conos dobles ya que los miembros principal y accesorio discurren yuxtapuestos sin interposición de células de Muller, las cuales separan todos los demás fotorreceptores (FIG. 14). Esta yuxtaposición comienza a nivel de las gotas lipídicas y se continúa hasta los cuerpos sinápticos.

El segmento externo del cono principal está constituido por sáculos aplanados, abiertos la mayor parte por el lado opuesto al cilio de conexión. El segmento externo del cono accesorio presenta sacos más ampliados semejantes a los segmentos externos de los bastones. Es frecuente observar los repliegues de membrana conti-

nuándose con la membrana celular del segmento externo y comunicando el interior del saco aplanado con el medio extracelular. Generalmente por el lado opuesto entre el sistema de laminillas y la membrana celular existe una banda de citoplasma. Con gran frecuencia entre las laminillas y especialmente en la porción basal del segmento externo se ven vesículas voluminosas de muy diverso tamaño procedentes probablemente de la dilatación de los repliegues saculares. Los segmentos externos están unidos a los internos por los cilios de conexión del que se observan frecuentemente los centriolos basales (FIG. 14).

Los segmentos internos de ambos receptores están unidos sin interposición de células de Muller que separan todos los demás receptores a este nivel. En la zona más externa del segmento interno poseen cada uno de los dos conos una gota lipídica rodeada de una membrana (FIG. 14), siendo la del principal más grande de aspecto más pálido y abigarrado que la del accesorio que es pequeña, densa y a veces de aspecto finamente granular. La gota lipídica del cono principal está en estrecho contacto con las mitocondrias del elipsoide, que la rodea casi completamente, disposición que no se presenta en las demás gotas de los otros conos. El elipsoide parte desde la gota lipídica y cubre un tercio del segmento interno del cono principal y algo más en el cono accesorio. La mitocondrias del elipsoide del cono principal son grandes, similares a las de los conos simples y de crestas apretadas. Las mitocondrias en el accesorio son más pequeñas y de crestas más sueltas (FIG. 15).

El cono accesorio posee un paraboloide que ocupa casi todo

el segmento interno, muy bien definido y que permiten la identificación fácil del mismo a M.E. Está constituido por un acúmulo de cisternas y sacos procedentes del retículo endoplásmico, muy rico en glicógeno (FIG. 15). A nivel del paraboloide del cono accesorio el cono principal presenta un retículo endoplásmico y polirribosomas libres. En secciones transversales a nivel del segmento interno se aprecia la estrecha relación entre los dos conos, abrazando el cono principal al accesorio en la mitad de su perímetro (FIG. 15).

Los núcleos del cono principal y del accesorio se encuentran sistemáticamente situados a dos niveles en la capa de granos externos (FIG. 14), el núcleo del accesorio por su polo externo alcanza la limitante externa y en numerosos casos sobre todo en el embrión o pollos jóvenes forma una especie de hernia por encima de la misma, por el contrario el núcleo del cono principal se encuentra en el límite más interno de la capa de granos externos, observándose a M.E. como los dos núcleos se imbrican formando una columna.

La M.E. demuestra igualmente que los cuerpos sinápticos de ambos conos terminan al mismo nivel, el estrato más escleral de la capa plexiforme externa y en forma muy característica el cono principal abraza al cuerpo sináptico del cono accesorio (FIG. 14). El número de invaginaciones sinápticas del cono principal y accesorio es elevado cuando se ven en cortes transversales (FIG. 14). En cortes perpendiculares se puede observar de tres a cinco triadas en el cono accesorio y de cinco a siete en el principal.

## 2. Aves nocturnas

Los conos dobles son muy similares a los descritos en las aves diurnas, observándose que ambos tipos de conos el principal y el accesorio son mucho más finos. Otra característica que los diferencia de los conos dobles de las aves diurnas, es que en las nocturnas el cono accesorio carece de gota lipídica. Su segmento externo empieza mucho más abajo que el segmento externo del cono principal (FIG. 16).

#### IV - CONOS SIMPLES

Con microscopia óptica se distinguen dos tipos de conos simples, fácilmente identificables por su terminación a distintos niveles de la plexiforme externa (FIG. 13). Los conos simples fueron clasificados por Cajal en dos tipos, conos rectos y conos "oblicuos" descubiertos por él (Cajal 1893) (FIG. 9).

Los conos rectos (FIG. 17) tienen su núcleo situado en la zona media de la capa de granos externos, el cual se continúa por un filamento largo y estrecho que termina por un cuerpo sináptico de forma triangular, dotado de gran cantidad de filamentos basilares que se extienden horizontalmente por el estrato medio de la plexiforme externa; algunos de estos filamentos llegan a alcanzar el nivel más inferior de esta capa.

El núcleo de los conos oblicuos (FIG. 17) está situado en los tercios medio y superior de la capa de granos externos, lo más frecuente es encontrarlo inmediatamente por debajo de la membrana limitante externa. Se continúa por un filamento delgado y largo que sigue un trayecto flexuoso, emitiendo colaterales, característica que lo diferencia de otros tipos de conos que nunca las emiten. Termina por un cuerpo sináptico voluminoso en el estrato más interno de la plexiforme externa. El cuerpo sináptico adopta posiciones variables, muchas veces aparece totalmente invertido, con su base dirigida hacia el estrato medio de la plexiforme externa y en este lugar, sorprendentemente, hemos visto en algunos casos, que parecen establecer contacto con los filamentos basilares de los conos rectos (FIG. 17), lo cual implicaría que ambos conos, el recto y el oblicuo, harían sinapsis con un



mismo tipo de bipolar. Otras veces el cuerpo sináptico presenta su base dirigida lateralmente. Los filamentos basilares tienen tendencia a dirigirse hacia los estratos medio y superior de la plexiforme externa.

Con el método de Golgi no podemos distinguir más que los dos tipos de conos simples, recto y oblicuo, descritos anteriormente.

Mediante la técnica de digestión enzimática comprobamos la existencia de dos tipos de conos rectos, uno con gota amarilla y otro con gota roja (FIG. 8). La morfología de ambos es muy similar; tienen el núcleo situado por debajo de la limitante externa, en la zona media de la capa de granos externos, es ovalado y se continúa por un filamento estrecho y largo que termina por un cuerpo sináptico de forma triangular.

Debido a que los fotorreceptores aparecen aislados no podemos asegurar a que nivel de la plexiforme externa se encuentran sus cuerpos sinápticos, el cono recto rojo sabemos que se sitúa en la fila media (FIG. 17), pero el amarillo no podemos determinar con seguridad a que nivel termina. Tratando de aclarar este extremo hemos realizado mediciones de ambos tipos de conos rojos y amarillos; los amarillos miden aproximadamente 19,5  $\mu$ m y los rojos miden unas 20  $\mu$ m. Pensamos que por su morfología ambos pueden pertenecer a los conos rectos cuyo cuerpo sináptico termina en el nivel medio de la capa plexiforme externa, o quizás, el resto de gota amarilla termina en el nivel más externo.

Con M.E. pueden distinguirse dos tipos de conos simples, diferenciables por la densidad electrónica de sus gotas lipídi-

cas y por la organización del retículo endoplásmico. Utilizando la nomenclatura de Morris y Shorey (1967) distinguimos como tipo I que posee una gota lipídica homogénea y oscura (heavy stain of lead) y el cono tipo II que posee una gota lipídica también homogénea, del mismo tamaño que la del tipo I y situada al mismo nivel, pero tiene una densidad electrónica mucho más clara que la del tipo I (FIG. 18). Morris y Shorey dicen "los cuerpos sinápticos de ambos tipos de conos simples el tipo I y tipo II, se localizan por debajo de los cuerpos sinápticos de los bastones y conos dobles". Es decir, no terminan en la fila superior de la plexiforme externa pero tampoco nos aclara si termina en la fila media o en la inferior.

Empleando combinadamente la microscopia de luz en cortes de 1  $\mu$ m y sucesivamente la M.E. en cortes de 500  $\text{\AA}$ , hemos comprobado que las gotas rojas corresponden a las que en M.E. con las técnicas utilizadas por nosotros, aparecen homogéneas y pálidamente teñidas, es decir, las gotas características del cono tipo II de Morris y Shorey o cono recto (FIG. 19).

Mediante la misma técnica hemos comprobado que las gotas verdes corresponden a los conos tipo I, los que poseen una gota oscura y homogénea a M.E. y hemos considerado que pertenece a los conos oblicuos.

Los elipsoides de ambos tipos de conos, tipo I y tipo II presentan mitocondrias similares y dependiendo del plano del corte aparecen más grandes o más pequeñas, debido a que las mitocondrias centrales son más grandes que las periféricas.

El elipsoide del tipo II ocupa mayor espacio dentro del

segmento interno que el elipsoide del tipo I. Viendo ambos conos juntos, se aprecia claramente como el elipsoide ocupa menos espacio dentro del segmento externo que el del tipo II.

Inmediatamente por debajo del elipsoide, el cono tipo II o cono recto muestra un retículo endoplásmico bien organizado, en bandas paralelas de membranas entre las cuales aparecen abundantes acúmulos de ribosomas, luego se continúa con un retículo endoplásmico desorganizado hasta la limitante externa.

El cono tipo I no presenta nunca retículo endoplásmico organizado y todo el segmento interno desde el elipsoide hasta la limitante externa está representado por retículo endoplásmico desorganizado, es decir, no se aprecia las membranas en bandas paralelas y los ribosomas están libremente dispuestos.

Otro dato para diferenciar ambos tipos de conos es la situación del aparato de Golgi. En el cono recto o tipo II éste se sitúa por debajo de la limitante externa, entre ella y el núcleo. En el cono oblicuo o tipo I el aparato de Golgi está situado por encima de la limitante externa.

El núcleo del cono tipo II está situado en el tercio inferior de la capa de granos externos, mientras que el de tipo I ocupa hasta la parte superior de la misma.

En secciones perpendiculares (FIG. 19) hemos podido obtener imágenes casi completas de los conos tipo II que comprenden segmento externo, segmento interno, incluida la gota lipídica, filamento, núcleo, y cuerpo sináptico, comprobando que en todos los casos éste estaba situado en el estrato medio de la plexiforme externa correspondiendo pues al cono recto descrito con microscopia

óptica.

Con M.E. no hemos podido obtener imágenes completas del cono tipo I pero pensamos que el cono tipo I es el cono oblicuo descrito con microscopia de luz, aunque esta deducción la hacemos por exclusión ya que tenemos cortes perpendiculares, en los cuales obtenemos imágenes completas de conos rectos y conos dobles, viendo en ambos casos los cuerpos sinápticos completos y el nivel donde terminan, sin embargo obtenemos imágenes de conos tipo I que terminan bruscamente por debajo del núcleo, justo cuando empieza el filamento interno y debido a la longitud y cambio de dirección de dicho filamento nos es imposible con M.E. obtener una sección completa del cuerpo sináptico (FIG. 19).

Un tipo especial de cono de tipo II se encuentra en la denominada "área roja" de la retina de la paloma, localizada en el cuadrante dorsotemporal de la retina y caracterizada por una coloración roja difusa. Esta coloración no se debe a una mayor concentración de conos con gota lipídica roja sino a que presentan múltiples microgotas de color rojo, aparte de la gota grande principal, a lo largo de su segmento interno entremezcladas con el retículo protoplásmico (FIG. 6). En la paloma el resto de los conos con gota lipídica roja presenta una disposición estructural análoga a la descrita en la retina del pollo. Estos conos especiales, con microgotas fueron ya descritos en el siglo pasado con Schultze (1866).

#### V - CONTACTOS ENTRE FOTORRECEPTORES

Realizando cortes transversales seriados con M.E., a lo largo de toda la longitud de los fotorreceptores, observamos como a nivel de los segmentos externos, todos los receptores incluidos los conos dobles, se hallan separados entre si por largos procesos de células epiteliales, cargados de gránulos melánicos, estos procesos llegan a rodear los segmentos externos en sus porciones apicales. En esta zona es frecuente observar pequeñas formaciones laminares desprendidas de los discos membranosos, que forman el segmento externo, incorporadas al citoplasma de las células epiteliales, donde van a ser digeridos. Los segmentos externos están renovándose continuamente, las mitocondrias del elipsoide son las encargadas de ir sintetizando los discos membranosos, y las células epiteliales se encargan de digerirlos.

En el segmento interno a nivel de las gotas lipídicas y del elipsoide los fotorreceptores se hallan dispuestos en paquete, pero no establecen contactos especializados de membrana.

La superficie del segmento interno, no es lisa, sino que emite unas prolongaciones citoplásmicas a modo de vellosidades, que fueron descritas inicialmente en los fotorreceptores de los anfibios y reptiles (Carasso 1956-57-58), denominándolas "prolongaciones citoplasmáticas". En nuestras preparaciones de retina de aves hemos podido observar la presencia de contactos tipo desmosómico entre dos prolongaciones citoplásmicas o entre una de ellas y la membrana citoplásmica de un receptor próximo (FIG.20).

Los conos principal y accesorio a partir de la zona que contiene las gotas lipídicas y siempre a partir del elipsoide

presentan aposición de sus membranas, en íntimo contacto sin que hayamos podido comprobar contactos especializados entre ellos. Por supuesto, la membrana citoplásmica de cada uno de ellos en su borde "libre" presenta prolongaciones citoplásmicas análogas a las del resto de fotorreceptores. El cono principal se adelgaza por debajo del elipsoide y abraza en forma de semiluna al cono accesorio (FIG. 15). Esta disposición muy fácilmente comprobable con M.E. se observa igualmente en las preparaciones de receptores aislados donde el cono principal presenta una clara huella donde se aloja el accesorio (FIG. 9).

Externamente a la capa limitante externa no existen células de Muller sino finos procesos de ellas que se introducen entre los segmentos internos de los fotorreceptores separándolos entre sí. La capa limitante externa (FIG. 21) está formada por uniones tipo desmosómico que establecen entre sí las fibras de Muller, como ya es conocido, y por refuerzos de contacto, entre las fibras de Muller y los fotorreceptores. Esto es una disposición general en la retina de todos los tetrapodos, aunque en algunas especies (anfibios) los contactos entre fotorreceptores y células de Muller están más desarrollados.

Por debajo de la limitante externa los fotorreceptores se encuentran separados unos de otros por el citoplasma de las células de Muller y en algunos casos por las mazas de Landolt que ascienden hasta la limitante.

Es interesante comprobar la existencia de contactos especializados entre los cuerpos sinápticos de los fotorreceptores, ya que existen datos electrofisiológicos que hacen suponer en al

gunos casos una interacción entre ellos, antes incluso de la primera sinapsis de la vía visual. Los contactos entre fotorreceptores a nivel de su cuerpo sináptico pueden ser de dos tipos : tipo superficial y tipo invaginante.

Tipo superficial : es aquel que se establece por aposición de las membranas, ya sea de los cuerpos sinápticos o bien por sus filamentos basilares. En el área de contacto se densifican las membranas de ambos fotorreceptores, también se denominan "uniones estrechas" y son semejantes a las "zonulas occludens", es decir no existe ningún espacio entre las membranas estando sus capas más externas fusionadas. Otras veces los contactos de tipo superficial, son similares a las "zonulas adherens" existiendo entre ambas membranas un espacio, también son llamadas "uniones en hendidura".

En la retina de las aves, hemos comprobado la presencia de contactos tipo desmosómico entre los cuerpos sinápticos de conos. En la figura 22 se observan con claridad uno de estos contactos entre la base de un cono y un filamento basilar largo, que contiene vesículas y neurotúbulos, de otro cono próximo. También hemos visto contactos de este tipo entre el cuerpo sináptico de bastón y el cuerpo sináptico de un cono (FIG. 22).

También hemos podido demostrar la existencia del tipo de contacto invaginante (FIG. 23), ya sea por medio de un filamento basilar de un bastón penetrando en la triada de un cono, o bien filamentos basilares de los conos penetrando en las triadas de conos vecinos. El primer tipo de contacto invaginante de filamentos basales de bastones penetrando en el complejo sináptico del

como no se observa en los mamíferos, donde los cuerpos sinápticos de los bastones carecen de los filamentos basilares tan desarrollados en las aves. Lo que no podemos demostrar es que dichos filamentos basilares sean los componentes laterales o centrales de las triadas.

En el neuropilo inmediatamente por debajo de los cuerpos sinápticos se observan numerosos procesos celulares difícilmente identificables ya que incluso los cortes seriados (Sjostrand 1961) no permiten siempre demostrar su origen. Por su estructura se puede "sospechar" su identidad sin poderla afirmar rotundamente. Entre estos procesos se demuestran numerosos contactos especializados de membrana (FIG. 22), algunos de los cuales corresponden a terminaciones axónicas de células horizontales, pero en ocasiones se presentan contactos entre la membrana del fotorreceptor y alguno de estos procesos no identificados que bien pudieran corresponder a procesos dendríticos de células bipolares no invaginantes que establecen contactos superficiales tal como ocurre en la retina de los mamíferos. Este punto no podrá precisarse hasta la realización de un estudio con Golgi-M.E. de las células bipolares de las aves, todavía inexistente.



## VI - DESARROLLO EMBRIONARIO

La diferenciación de los distintos tipos de fotorreceptores por el color de su gota lipídica puede hacerse a partir del día 16 de incubación. Gotas lipídicas incoloras, se aprecian a partir del día 13 y con anterioridad, desde el día 7 se observan células unidas a la línea ventricular en las que aparecen filamentos que parece ser el primer signo de diferenciación en fotorreceptores.

El estudio se ha llevado a cabo en retinas enteras y estudiadas en fresco, mediante el método de Golgi-Stensaas y por el procedimiento de aislamiento celular por digestión enzimática.

El estudio en fresco de la retina entera montada de plano con la capa de fotorreceptores hacia arriba ha permitido comprobar (FIG. 6) que aparecen las primeras gotas lipídicas a partir del día 13 de incubación, siendo todas ellas pequeñas e incoloras. El número de gotas aumenta en los días 14 y 15, siendo todavía incoloras. A partir del día 16 se constata la presencia de gotas coloreadas, verdosas, amarillas y rojas, que se observan simultáneamente; algunas gotas siguen siendo incoloras. El número y tamaño de las gotas coloreadas aumenta en días sucesivos y a partir del día 21 el contenido en gotas lipídicas coloreadas es similar cualitativamente al de la retina del animal recién nacido y del adulto.

El clásico método de Golgi, si bien en el adulto permitió a Cajal describir los conos rectos y oblicuos, no es un buen método para estudiar la diferenciación de los fotorreceptores en la retina embrionaria, mejores resultados proporciona la varian-

te de Stensaas al método de Golgi. Los primeros signos de diferenciación de las células ventriculares en fotorreceptores aparecen a partir del día 7 de incubación (FIG. 24) cuando muestran filamentos principalmente por su polo vitreal y el núcleo comienza a separarse de la línea ventricular a la que queda unido por la parte de citoplasma que dará posteriormente al segmento externo del fotorreceptor. Entre los días 13 y 14 los núcleos se van separando progresivamente de la línea ventricular y comienzan a aparecer en el polo vitreal los esbozos de lo que serán los cuerpos sinápticos. El día 16 se observan imágenes de fotorreceptores con diferenciación evidente de las partes celulares externa, comprendiendo desde el núcleo hasta el segmento externo, e interna, en la que se van perfilando claramente los cuerpos sinápticos, lo que permite comenzar a diferenciar morfológicamente los conos dobles, en especial el miembro principal, los conos rectos y los bastones. Es sin embargo a partir del día 18 cuando la diferenciación morfológica de los distintos tipos de fotorreceptores es clara, observándose bastones, conos rectos, oblicuos y conos dobles.

El método de disociación enzimática nos ha dado excelentes resultados para el estudio de la diferenciación de los fotorreceptores a partir del día 11 de incubación (FIG. 25 y 26). En días anteriores no hemos podido identificar claramente, con esta técnica las fases previas de diferenciación de las células ventriculares. Los elementos redondeados o ligeramente ovalados que observamos el día 11 se van alargando progresivamente unos y otros, que conservan el aspecto redondeado, muestran una pequeña

expansión en su polo externo. Esta tendencia se encuentra muy marcada en el día 13, en el que los elementos más diferenciados presentan ya una gota lipídica pequeña e incolora. En el día 14 aumenta el número de elementos con gotas lipídicas más grandes pero aún incoloras y se observan en el polo interno los esbozos de los cuerpos sinápticos. A partir del día 15 se comprueban claramente conos dobles con gota verdosa, rectos con gotas rojas y amarillas, oblicuos con gota verde, mezclados con fotorreceptores menos diferenciados, similares a los observados los días 13 y 14. A partir del día 16 encontramos diferenciados todos los fotorreceptores presentes en la retina adulta incluidos los bastones. Su longitud aumenta hasta el nacimiento, por ejemplo el miembro principal del cono doble que tiene una longitud entre 17,5 y 22,5 micras el día 15, el 18 ha alcanzado una longitud de 37,5 micras; los conos rectos pasan de 25 micras el día 15 a 42,5 micras el día 20 y donde se aprecia un crecimiento mayor es en los conos oblicuos que de 25 micras de longitud el día 15 pasan en algunos casos a 60 micras ya el día 18. Dado que la técnica de digestión enzimática se ha aplicado a retinas enteras estos datos, casi cualitativos, no se refieren a zonas retinianas bien definidas.

## B) CELULAS HORIZONTALES

### I - CELULA HORIZONTAL DE AXON CORTO

Hemos encontrado tres tipos de células horizontales : de axon corto y dos variedades de célula horizontal sin axon. Al utilizar la impregnación argéntica de la retina entera y estudiada de plano, hemos podido teñir la célula en brocha o célula horizontal de axon corto, junto con su terminal axónica en varias especies de aves (FIG. 27).

Se ha descrito en el resto de los tetrapodos un solo tipo de célula horizontal de axon corto para cada retina (excepto en los primates) que presenta diferencias morfológicas relativas al tamaño y número de dendritas, longitud del axon y estructura de la terminal axónica.

En las aves, entre distintas especies son también constatables diferencias morfológicas, siendo especialmente interesante, como veremos, la estructura de la terminal axónica en las aves nocturnas, que hasta cierto punto se asemeja a la de los mamíferos, retinas que como las de las aves nocturnas son ricas en bastones.

En los animales adultos y tomando como modelo las gallináceas, las células en brocha poseen un soma redondeado, pequeño de 8 a 10 micras de diametro, situado en la fila más externa de la capa de granos internos. Del soma parten varias expansiones dendríticas gruesas, que se van dividiendo repetidamente, dirigiéndose hacia los pies de los fotorreceptores, formando un tupi

do árbol dendrítico en forma de brocha (FIG. 28). La mayor parte de las dendritas alcanza el nivel más externo de la plexiforme externa, aunque también posee dendritas dirigidas hacia el nivel medio e interno de la plexiforme. El área que cubren las dendritas es del orden de 20 micras de diámetro. El axon tiene 1 o 2 micras de diámetro y una longitud de 300 a 400 micras, no emite colaterales durante su trayecto y suele seguir un curso rectilíneo, terminando en una estructura formada por el ensanchamiento del axon que alcanza 4 a 6 micras de diámetro y da varias ramificaciones adoptando forma de palmera. De esta estructura parten finas ramitas que se dirigen hacia los cuerpos sinápticos de los fotorreceptores. El área que cubre dicha terminal tiene forma circular de casi 30 micras de diámetro. En cortes perpendiculares se puede apreciar que las terminales axónicas se sitúan en el nivel más superior de la plexiforme externa.

Esta descripción general es válida para todas las especies de aves que hemos estudiado, tanto diurnas como nocturnas. Sin embargo como hemos mencionado más arriba, existen diferencias morfológicas, referidas al soma, dendritas, longitud del axon y estructura de la terminal.

Los falcónidos, presentan un soma menos redondeado que las gallináceas y aves nocturnas, las dendritas son menos numerosas y más alargadas, se van dividiendo progresivamente y las ramas finales, más finas presentan pequeños ramilletes provistos de escasos botones terminales, 3 ó 4 a lo sumo (FIG. 28). Esta morfología del soma no encajaría completamente con la disposición en brocha descrita por Cajal en las gallináceas y alguna otra espe-

cie y parece ser característica de los falcónidos.

El axon tiene una longitud de 100 a 300 micras y la terminal axónica se forma por engrosamiento del axon, al dividirse en procesos gruesos adquiere un aspecto de palmera (FIG. 29). De estos procesos parten finas y cortas fibras que dirigiéndose a la capa más externa de la plexiforme terminan en pequeños botones aislados, en vez de en forma de ramilletes como sucede con las finas terminales dendríticas. El área que cubre la terminal axónica tiene forma ovalada de 25 x 40 micras.

Las aves nocturnas, tienen un soma redondeado similar al de las gallináceas, las dendritas adoptan la forma clásica de brocha, sin embargo su número es menor y se proyectan hacia la plexiforme externa en forma algo más divergente. La longitud del axon es superior al de las aves diurnas, como ya había sido señalado previamente (Gallego 1976), siendo de 600 a 800 micras. Es muy interesante la morfología de la terminal axónica, la cual en aves de hábito puramente nocturno como es la lechuza se asemeja a las terminales axónicas de los mamíferos inferiores. El axon comienza engrosándose y se divide dicotómicamente en ramas cada vez más finas, de estas ramas parten ramitas dirigidas hacia los cuerpos sinápticos de los fotorreceptores, que terminan por pequeños botones aislados. El número de estos botones es considerablemente superior al que presentan las terminales axónicas de las aves diurnas, lo que indudablemente está en relación con el mayor número de bastones que contienen y con cuyos cuerpos sinápticos entran en contacto como veremos más adelante. El área que cubre la terminal suele ser redondeada con un diámetro de 50 mi-

cras, abarcando por lo tanto una superficie de 1962 micras<sup>2</sup> aproximadamente. Con microscopia electrónica se observan los gruesos procesos de las terminales axónicas provistos de neurofibrillas y forman un plexo situado entre los cuerpos sinápticos de los fotorreceptores y los somas de las células horizontales según describió Gallego y cols. (1975 b). El diámetro del tronco de la terminal es en ocasiones análogo al de células horizontales situadas más escleralmente (FIG. 30). Desde un punto de vista funcional son interesantes los abundantes contactos de membrana que muestran en algunos casos pequeñas vesículas a ambos lados (FIG. 31). En numerosas ocasiones hemos observado las finas ramitas, algunas muy cortas, que nacen de estos procesos y que llegan a penetrar en los complejos sinápticos de los fotorreceptores. Cuando no se ve el origen de una de estas ramas terminales, no pueden ser identificadas por su contenido en neurotúbulos, ya que también los poseen las finas dendritas terminales y los filamentos basales de los fotorreceptores.

## II - CELULA HORIZONTAL SIN AXON TIPO I

Nuestros estudios, en la retina del pollo, confirman la presencia de dos tipos de células horizontales sin axon.

La célula tipo I o biperachada (FIG. 32) posee un soma pequeño de unas 10 micras de diámetro, situado a nivel de la fila más externa de la capa de granos internos, estos somas se hallan intercalados entre los núcleos de las células en "brocha". Del soma parten de 7 a 9 procesos celulares gruesos dirigidos en direcciones opuestas, vistas de plano le confiere a la célula un aspecto biperachado. En cortes perpendiculares, se asemejan mucho a las células en brocha, se diferencian de ellas por tener las dendritas más largas, menos numerosas y mucho más divergentes, adoptando la forma de candelabro, denominación propuesta por Genis y cols. (1979). Los procesos celulares de unas células se imbrican con las células próximas formando hileras. Es muy característico de las células sin axon, tanto las de tipo I como las de tipo II, esta disposición en plexos, a diferencia de las células de axon corto que aparecen aisladas, sin tener imbricaciones con las células próximas.

De las dendritas parten finas colaterales que sin dividirse, se dirigen hacia el nivel más superior de la plexiforme externa donde terminan por un par de botones que entran en contacto con los cuerpos sinápticos de los fotorreceptores. El número de botones terminales de cada ramito es pequeño, de uno a tres, por lo que no llegan a formar ramilletes como las dendritas de las células horizontales de axon corto.



### III - CELULA HORIZONTAL SIN AXON TIPO II

La célula horizontal estrellada o tipo II (FIG. 33) posee un soma situado en la línea más externa de la capa de granos internos, quizás ligeramente por debajo de los somas de las otras células horizontales anteriormente descritas. En secciones perpendiculares, no podemos hacernos una idea clara de la morfología de esta célula, ya que las finas fibrillas terminales que parten de los gruesos procesos celulares y dirigidas hacia los cuerpos sinápticos de los fotorreceptores son muy difícilmente visibles. En dichas secciones estas células adoptan un aspecto totalmente aplanado, con los gruesos procesos celulares dirigidos en direcciones opuestas.

En retinas enteras y vistas de plano, por el contrario, se comprueba perfectamente la morfología de este tipo celular, el soma suele ser rectangular, tiene unas dimensiones de 10 micras de diámetro máximo y de él parten gruesos procesos celulares que se van dividiendo sucesivamente, dando a la célula el aspecto estrellado, el área cubierta, por estas expansiones celulares es prácticamente circular y tiene un diámetro de 100 micras. De los gruesos procesos celulares parten pequeñas fibras colaterales muy cortas y escasas que terminan por botones muy finos que sólo en algún caso llegan a formar ramilletes de 4 ó 5 botones, siendo la mayor parte de las veces de 1 a 3. Muy importante es comprobar que estos finos ramilletes no alcanzan nunca el nivel más externo de los cuerpos sinápticos de los fotorreceptores, quedando localizados en el nivel intermedio de la plexiforme externa.

Como hemos mencionado anteriormente, con microscopia elec-

trónica no es posible distinguir los diferentes tipos de células horizontales, aunque a veces por la disposición de los procesos celulares que parten del soma se puede sospechar la identidad de éstos, pero no pueden identificarse con absoluta seguridad ya que tanto la estructura del núcleo como la del citoplasma parece ser igual en los tres tipos de células horizontales. El citoplasma presenta abundantes polirribosomas y cisternas, encontrándose frecuentemente cuerpos ciliares, filamentos mioides y en ocasiones (FIG. 34) estructuras diferenciadas que recuerdan al cristaloide de Kolmer descrito en la retina de los primates. En los casos en que se obtiene en el corte el comienzo del axon se comprueba la presencia de neurotúbulos desde el comienzo del mismo (FIG. 34). El núcleo es poco denso en cromatina.

No hemos observado en ningún caso la presencia de sinapsis químicas o contactos de membrana especializados sobre la membrana de las células horizontales.

#### IV - DESARROLLO EMBRIONARIO DE LAS CELULAS HORIZONTALES

Para el estudio del desarrollo embrionario de las células horizontales en pollo hemos utilizado las variantes de Colonnier y Stensaas al método de Golgi estudiando la retina en cortes perpendiculares y teñida in toto y examinada de plano.

Es interesante recalcar la necesidad de utilizar varios métodos histológicos para determinar con seguridad los tipos de células horizontales, debido a que con las dos variantes del méto-do de Golgi se obtienen tinciones celulares en distintos días del desarrollo embrionario.

Los tres tipos de células horizontales detectados en la retina del pollo : de axon corto y tipos I y II de células horizontales sin axon, se demuestran ya inequívocamente entre los días 17 y 18 de incubación (FIG. 35, 36, 37 y 38). El axon de la célula de axon corto se detecta a partir del día 13; desde este día y en días sucesivos se comprueban a nivel de la capa plexiforme externa células horizontales con inicios de axon, células horizontales con procesos dendríticos del tipo de las células en brocha sin axon y los días 13 y 14 elementos celulares situados al nivel de las células horizontales pero que presentan prolongaciones fi-nas en varias direcciones, orientadas sin embargo principalmente hacia los fotorreceptores. En días anteriores, y a partir del día 8 de desarrollo embrionario, comienzan a observarse a nivel de la capa de células amacrinas y luego en el seno de la capa granulosa interna elementos celulares con soma ovalado en el eje perpendicular de la retina, provistas de prolongaciones orientadas princi-palmente hacia el polo escleral y el polo vitreal. Estas células

que inicialmente se encuentran al nivel de la capa de las células amacrinas van observándose cada vez en situación más próxima a la capa plexiforme externa (FIG. 24).

Estudiando las retinas de embriones de pollo, nos sorprendió la aparición de un tipo celular hacia el 7º día de incubación, localizado entre la plexiforme interna, que se está desarrollando en estos días, y los fotorreceptores que están muy poco formados. Este tipo celular se caracteriza por un soma ligeramente ovalado, con el eje mayor perpendicular a la retina, del que parten pequeños procesos celulares orientados hacia las dos capas plexiformes, conforme se va aproximando a la plexiforme externa va perdiendo alguno de los procesos celulares internos, conservando alguno de ellos cuando ha alcanzado el nivel de los pies de los fotorreceptores. Los procesos celulares externos se mantienen y se hacen más abundantes (FIG. 24).

Estas mismas imágenes se ven en las retinas de embriones de 8 días de incubación.

En cortes perpendiculares y a partir del 11 día de desarrollo embrionario, el tipo celular antes descrito se ve ya situado en la plexiforme externa y coexiste con un tipo de célula horizontal primitiva cuyo soma y dendritas están perfectamente diferenciados. Las formas intermedias presentan procesos celulares polarizados hacia los fotorreceptores, pero también pueden presentar algunos procesos dirigidos hacia la plexiforme interna.

Estudiando las retinas enteras y vistas de plano, con el método de Golgi-Colonnier, hemos podido teñir estas células horizontales primitivas, las cuales presentan un soma redondeado y pro-

visto de procesos celulares pequeños y cortos orientados en todas direcciones, en esta etapa del desarrollo no logramos ver el axon.

A los 12 días de incubación, ya no encontramos el tipo celular con procesos esclerales antes descrito, sólo en alguna ocasión, de lo que van a ser las futuras dendritas de las células horizontales parte algún proceso dirigido hacia la granulosa interna, encontrándose todos los demás hacia los fotorreceptores.

Hacia el 13 ó 14 día de incubación se encuentran las células horizontales claramente identificadas, incluso aparece el cilindroeje en formación de las células de brocha y en alguna ocasión parece distinguirse las células horizontales con las características morfológicas de la célula sin axon tipo I.

Podemos afirmar que hacia el día 17 de incubación, aparecen perfectamente diferenciadas las células horizontales sin axon tipo II o estrelladas, éstas aparecen ya con todas las características morfológicas de las células estrelladas adultas, sólo tienen un tamaño menor y el árbol dendrítico menos desarrollado.

Estudiando las retinas planas, se observan las células de brocha provistas de axon, el cual sigue un trayecto tortuoso y retorcido, característica que las diferencia de las células adultas, cuyo axon sigue un trayecto perfectamente horizontal. Estos axones retorcidos se mantendrán durante todo el período embrionario, se vuelven rectos y horizontales después del nacimiento.

Al 15 día de incubación se diferencian perfectamente en los cortes perpendiculares, las células de brocha con axon y se puede observar el trayecto ondulante de dicho axon, y claramente podemos distinguir las células horizontales sin axon tipo I, éstas

con el método de Golgi-Colonnier no nos aparecen hasta el 18 día de incubación.

Al 16 día podemos observar terminales axónicas ricas y claramente diferenciadas y la célula sin axon tipo II o estrellada.

A partir del 17 día de desarrollo embrionario, los tres tipos de células horizontales están perfectamente diferenciados y se van haciendo más evidentes en los días subsiguientes de desarrollo hasta el nacimiento.

A los 18 días las células horizontales de axon corto o de brocha (FIG. 35 y 36), se caracterizan por tener un soma pequeño de 10  $\mu$ m de diámetro, del cual parten múltiples dendritas y un axon cuya longitud es de 100-150  $\mu$ m, que en el pollo alcanza 300-400  $\mu$ m de longitud. Las dendritas se ramifican en fibras más finas y terminan en pequeños y apretados ramilletes, cada ramillete está formado por 4 ó 5 botones que cubren un área ligeramente menor que la correspondiente al cuerpo sináptico de un cono.

La terminal axónica es una gruesa estructura en forma de palma de la que salen las finas fibras terminales que se dirigen hacia los cuerpos sinápticos de los fotorreceptores, terminando en botones aislados sin formación de ramilletes. Estos botones son más gruesos que los encontrados en los ramilletes dendríticos.

La célula sin axon tipo I se caracteriza por presentar un soma pequeño de 8 a 10  $\mu$ m. de diámetro del cual salen las dendritas, éstas sin ramificarse se dirigen directamente hacia los cuerpos sinápticos de los fotorreceptores para terminar en uno o dos botones a diferencia de las células de brocha que lo hacen en ramilletes con varios botones terminales.

En las retinas de pollo, las dendritas de la célula sin axon tipo I son más alargadas y se dirigen en direcciones opuestas, por lo que vistas de plano les da un aspecto bipenachado, en las retinas de embriones de 18-19 días (FIG. 37) las dendritas no están todavía perfectamente orientadas en direcciones opuestas, presentando una disposición que ha inducido a Genís a denominarlas células horizontales en candelabro.

A los 18 días de incubación las células sin axon tipo II o estrelladas (FIG. 38) tienen un aspecto muy similar al de las células adultas, presentan un soma redondeado de 8 a 10  $\mu\text{m}$ . de diámetro, de donde arrancan procesos celulares en todas direcciones, estos procesos se van ramificando sucesivamente hasta cubrir un área circular de 60-80  $\mu\text{m}$ . de diámetro. Las finas fibras terminales parten de los procesos celulares y se dirigen hacia los cuerpos sinápticos de los fotorreceptores, terminando en pequeños ramilletes de botones en formación ya que aparecen, en algunas células, menos definidos que en el pollo recién nacido.

### C) CONEXIONES ENTRE FOTORRECEPTORES Y CELULAS HORIZONTALES

La M.E. convencional proporciona información interesante, pero no suficiente, para esclarecer las conexiones que establecen las células visuales y horizontales.

En el apartado "contactos entre fotorreceptores" (FIG. 22 y 23) hemos analizado los datos estructurales de posible interés funcional, especialmente los dos tipos de contactos que establecen entre sí los fotorreceptores, "superficial" e "invaginante". Sólo señalaremos aquí algunos datos complementarios sin detenernos en los ya sobradamente conocidos de ultraestructura de los cuerpos sinápticos.

En repetidas ocasiones hemos comprobado que el elemento central de las triadas en los conos, correspondiente con toda probabilidad a la fina terminal dendrítica de una bipolar, presenta (FIG. 39 A y B) un aspecto como de maza, con su porción ensanchada en contacto con la membrana presináptica, con poca densidad electrónica y sin vesículas. En la FIG. 39 B, se ven vesículas del cuerpo sináptico del cono fundidas con la membrana y abiertas al espacio intersináptico.

Un dato que nos ha llamado la atención es la presencia constante en retinas de embriones y animales recién nacidos de fotorreceptores "blancos", caracterizados por la escasez de estructuras citoplásmicas y sus anomalías. Estas características se presentan tanto en conos, especialmente el principal, como en bastones (FIG. 39 C y D). El cuerpo sináptico del cono presenta muy escasas vesículas y un citoplasma poco denso electrónicamente (FIG.



39 D) con algunas cisternas sin contenido. El cuerpo sináptico de estos bastones (FIG. 39 C) "blancos" presenta vesículas irregulares en tamaño, algunas grandes con núcleos densos, así como cisternas vacías y las mitocondrias son grandes e irregulares sin crestas organizadas, 'sustituidas por pequeñas cisternas. Los sacos de la membrana del paraboloide están vacíos sin contener glucógeno. Este tipo de fotorreceptores blancos lo consideramos como anormal y suponemos que se debe a un insuficiente aporte de vitamina A, supuesto que habría de ser comprobado experimentalmente.

La plexiforme externa (FIG. 40) muestra una gran complejidad en la que podemos distinguir claramente las grandes estructuras, llenas de neurofilamentos, que corresponden a las terminales axónicas y por supuesto los cuerpos sinápticos de los conos rectos y oblicuos cuando aparecen en su seno (FIG. 10 y 40). Los finos procesos celulares que forman la plexiforme externa sólo son identificables "por aproximación", por su contenido en vesículas o neurofilamentos, pero es imposible hacer una identificación precisa de los procesos de los distintos tipos de células bipolares y horizontales.

La estructura del cuerpo sináptico del cono recto (FIG. 40) es similar a la del resto de conos : abundantes vesículas, que se ven incluso aunque con menor densidad, en el filamento que le une al núcleo y filamentos basilares. La estructura de las triadas es parecida a la de los otros conos. Los pies sinápticos de los conos oblicuos presentan un mayor número de vesículas sinápticas. Con M.E. (FIG. 41) se comprueba como los contactos que parecen es tablecer algunos pies sinápticos de los conos rectos con los obli

cuos (FIG. 17) están formados por procesos que parecen destinados a ambos, que se encuentran en íntimo contacto.

En algunas ocasiones (FIG. 42) se observan finos procesos terminales penetrando en la triada de conos, como elementos laterales, y en el complejo sináptico de los bastones. En los casos observados estos procesos parten de otros más gruesos, provistos de neurofilamentos, que probablemente pertenecen a terminales de células horizontales pero sin que podamos con seguridad identificarlas como procedentes de la terminal axónica de la célula de axon corto o de los procesos terminales de las células sin axon tipo I o II.

El procedimiento más eficaz para esclarecer las conexiones entre fotorreceptores y células horizontales es la técnica de Golgi-M.E. (FIG. 43), que al estudiar una célula aislada y teñida (FIG. 43 A) permite, en los cortes para M.E., identificar la localización del precipitado de cromato de plata en las finas terminales celulares y su relación con elementos vecinos. En la FIG. 43 B, se observa una fina terminal dendrítica de una célula de axon corto que forma el componente lateral de la triada de un cono y, en la FIG. 43 C, una terminal axónica penetrando en el complejo sináptico de un bastón.

Los dibujos de la FIG. 44, calcados de microfotografías obtenidas con M.E. resumen de los datos obtenidos, muestran como la célula horizontal de axon corto contacta por sus dendritas con los cuerpos sinápticos de los conos dobles, rectos y oblicuos, por sus terminales axónicas con los cuerpos sinápticos de bastones y algún cono de la capa más externa de la plexiforme (FIG. 44

A). Los procesos de las células horizontales sin axon de tipo I penetran en las triadas de conos situados en la fila más externa de la plexiforme (FIG. 44 B) en especial de los conos dobles, y los procesos celulares de la célula horizontal sin axon de tipo II penetran en los cuerpos sinápticos de los conos rectos y oblicuos.

#### D) CELULAS BIPOLARES

Si bien nuestro objetivo es el de estudiar los fotorreceptores y células horizontales así como sus conexiones a nivel de la capa plexiforme externa, el conocimiento de la organización sináptica de esta capa requiere también un estudio de las células bipolares que en la retina de las aves no han sido estudiadas desde los trabajos de Cajal. Hemos llevado a cabo un estudio preliminar con el método de Golgi que deberá ser seguido en el futuro por el análisis de las conexiones de cada tipo de bipolar identificado con el método Golgi-M.E.

Dado que los datos obtenidos hasta ahora aportan nuevos conocimiento útiles para entender la organización de la capa plexiforme externa, hemos creído interesante incluirlos en el presente trabajo.

La descripción de Cajal de las células bipolares de las aves es muy somera : los divide en dos grupos : externas, situadas (el núcleo) por debajo de la capa, e internas o finas, que ocupan (el núcleo) todo el resto de la capa de bipolares.

El penacho ascendente de las bipolares "externas" es muy rico y desprovisto (probablemente) de masa de Landolt, mientras que el penacho correspondiente de las bipolares finas o internas nace de la extremidad de un proceso ascendente en lugar de proceder, como en las células precedentes, del propio cuerpo celular y se compone de un número reducido de fibrillas horizontales dispuestas sobre uno de los tres pisos de la capa plexiforme externa (FIG. 45 B y C).

Según Cajal es probable que la b. gruesa conexione con bastones y la fina con conos, como sucede en los mamíferos.

En nuestras preparaciones de retina entera estudiada de plano no nos sorprendió inicialmente la riqueza y variedad de los penachos de las células bipolares, lo que nos llevó a estudiarlos también en cortes perpendiculares de retina de embriones y adultos de gallináceas así como de los falcónidos.

Como consecuencia de este estudio llegamos a distinguir diferentes tipos de bipolares caracterizados por la situación y área que cubre su penacho dendrítico así como por los caracteres morfológicos del mismo.

Con arreglo a estos criterios hemos llegado a diferenciar varios tipos de bipolares, que provisionalmente designaremos con los números 1 a 5 (FIG.45 A ). Como dato previo de interés para el análisis de sus posibles conexiones aportaremos el diámetro de la base del cuerpo sináptico de los conos que viene a ser de un promedio de 3 a 4 micras, si se incluyen en el área que cubre el receptor los filamentos basilares, ésta puede llegar a tener 15 micras de diámetro y aún más.

#### BIPOLARES DE TIPO 1

Se distinguen por poseer un penacho dendrítico pequeño, procedente del proceso celular único que se origina en el núcleo y de longitud variable según la situación de éste, de 3-4 micras de diámetro medido en cortes perpendiculares y visto de plano en retinas íntegras teñidas con el método de Golgi. Según posean o no masa de Landolt y su situación en los distintos niveles de la ca-

pa plexiforme externa encontramos los siguientes subtipos :

- 1a : Con maza de Landolt y nivel más externo de la capa plexiforme externa. El penacho dendrítico está formado por finas y compactas ramas terminales en alguna de las cuales se aprecia un botón único. Generalmente la maza de Landolt se continúa directamente o previo un ligero engrosamiento con el proceso único que parte del cuerpo celular quedando el penacho dendrítico lateralmente situado a la maza de Landolt. La maza de Landolt alcanza siempre, salvo alguna rara excepción, la capa limitante externa, la que sobrepasa ligeramente formando un pequeño engrosamiento.
- 1b : Es idéntica a la anterior salvo que carece de maza de Landolt.
- 1c : Su descripción es idéntica a las 1a y 1b, salvo en que le penacho dendrítico se encuentra situado en el nivel medio de la capa plexiforme externa.

#### BIPOLARES DE TIPO 2

Poseen dos penachos dendríticos pequeños, anchos, de 3-4 micras de diámetro, situados a distinto nivel. Las que hemos podido observar tenían todos maza de Landolt.

El penacho superior o externo se encuentra situado en el nivel escleral, o más externo de la capa plexiforme externa, mientras que el inferior se distribuye por el nivel medio, aproximadamente 2 micras por debajo del anterior.

### BIPOLARES DE TIPO 3

Poseen un penacho dendrítico más amplio que el de los anteriores, aproximadamente circular y con diámetros del orden de las 15 micras. Tienen (3a) o no (3b) maza de Landolt.

El penacho está formado por fibras más largas y dispersas que en el caso de las bipolares tipos 1 y 2, y que se disponen casi horizontalmente, terminando habitualmente por pequeños engrosamientos en forma de botones.

### BIPOLARES DE TIPO 4

Poseen un núcleo situado en plena capa granulosa interna del que parte un grueso proceso, que se divide en ramas más finas y dispersas, terminado por ligeros engrosamientos. Es muy característico de este tipo de bipolar la disposición de sus ramas finales en forma de copa, que ocupan un área circular de 20-25 micras de diámetro, dirigidas hacia los niveles más altos de situación de los cuerpos sinápticos de los fotorreceptores. Se encuentra este tipo de bipolar provisto (4a) o carente (4b) de maza de Landolt.

### BIPOLARES DE TIPO 5

Lo más característico de este tipo de bipolar es que su núcleo está situado en la línea más externa de núcleos de la capa granulosa interna. Del núcleo parten procesos dendríticos compactos y cortos que terminan en el nivel más externo de la capa plexiforme externa. El área ocupada por estos procesos, aproximadamente circular, tiene un diámetro de 90 micras. En este tipo bipo

lar no hemos visto maza de Landolt. Corresponde a la descripción de bipolar externa, gruesa, de Cajal.

#### BIPOLARES DE TIPO 6

Este tipo de bipolar sólo ha podido ser comprobado en retinas íntegras vistas de plano, no habiéndola encontrado en cortes perpendiculares. Su arborización dendrítica está formada por dos o tres gruesas ramas que se dividen repetidamente, terminando por ramas finas que en algunos casos presentan engrosamientos terminales. No hemos visto en ellas maza de Landolt. El área cubierta por el penacho dendrítico tiene siempre diámetros superiores a las 30 micras; en algún caso hemos medido hasta 70 x 100 micras.

Aunque no podemos precisar con absoluta seguridad las conexiones de las bipolares con los fotorreceptores a falta del estudio con la técnica Golgi-M.E., que continuamos, sí podemos llegar a hipótesis de contactos probables al considerar la localización y tamaño de su arborización dendrítica. No concedemos significación funcional a la maza de Landolt ya que en preparaciones de microscopia electrónica nunca se ha podido detectar ningún tipo de contactos con los fotorreceptores. Creemos que es un resto embrionario, lo que explica que en algunos casos no llegue a alcanzar la limitante externa y el que bipolares con penachos dendríticos, idénticos en tamaño y localización, presenten unas y otras no, dichas mazas de Landolt.

Siguiendo el criterio de localización suponemos, provisoriamente, que la bipolar tipo 1 es una bipolar individual de co-



no, las 1a y 1b para conos situados en el nivel más externo de la plexiforme, probablemente conos dobles, y la 1c para conos rectos y oblicuos. La bipolar tipo 2 probablemente conecta conos de la primera capa (conos dobles) y conos rectos. La bipolar tipo 3 parece una bipolar para varios conos de la primera capa y las de tipo 4 y 5 son sospechosas de ser bipolares para bastones.

Por supuesto es necesario proceder al estudio con la técnica Golgi-M.E. para determinar con precisión este tipo de conexiones, trabajo ya iniciado en nuestro laboratorio.

## DISCUSION

Frente a la afirmación de Cajal (1893) de que la estructura de la retina no difería sustancialmente entre las diversas especies de vertebrados, ha resultado ser más cierta la observación de Polyak (1941) al escribir que dicha estructura era más compleja de lo supuesto por el histólogo español. Cajal estaba en lo cierto al describir la organización básica, común para los vertebrados; en vías centrípetas, para conos y para bastones, los sistemas transversales de conexión intrarretiniana a través de las células horizontales y amacrinas y una vía centrífuga, la crítica de Polyak se refería únicamente a detalles estructurales de la retina de los primates, que incidentalmente Cajal no había estudiado. Lo que los estudios modernos han puesto de manifiesto, y nuestros resultados apoyan fuertemente, es el hecho de que sobre una base organizativa propuesta por Cajal, las diversas especies de vertebrados presentan diferentes peculiaridades celulares y de organización, hecho que debe ser conocido para cada caso si pretendemos interpretar correctamente el gran flujo de información que se está obteniendo merced a las técnicas electrofisiológicas y de registro intracelular. Baste señalar, por ejemplo, que la vía centrífuga ampliamente desarrollada en las aves, según demostró el propio Cajal, está representada por un número muy escaso de fibras, difusamente distribuidas, en la retina de los primates (Reperant y Gallego, 1976), y no se ha detectado en mamíferos inferiores, reptiles y anfibios, o bien que los tipos de fotorrecepto

res, bipolares y células horizontales varían muy significativamente de unas especies a otras (ver Introducción).

Lo que parece evidente es que, dentro de una organización general común, existe gran diversidad morfológica y bioquímica en la retina de los vertebrados. Para Crescitelli (1972) todas las diferencias se han producido, no a través de factores fortuitos en la evolución, sino más bien gracias a la interacción de la selección natural con los distintos ambientes fóticos. En otras palabras, que los cambios estructurales que apreciamos entre diversas especies parecen tener un valor adaptativo en relación con el ambiente fótico.

La argumentación de Crescitelli se basa en la comprobación de que los fotopigmentos de las células visuales de distintas especies presentan máximos de absorción en las longitudes de onda predominantes en la luz ambiental. El ejemplo más significativo es el del sistema de fotopigmentos de los peces que viven a grandes profundidades, tanto teleosteos y elasmobranquios como quiméridos, cuyas propiedades de absorción de luz están adaptadas a la luz verde azulada de las aguas profundas (Gallego, 1975 c). Las modificaciones bioquímicas de valor adaptativo van acompañadas de variaciones morfológicas, por ejemplo los elasmobranquios, en especial los tiburones que habitan profundidades medias, poseen únicamente bastones con una densidad de fotopigmento relativamente alta (Gallego, 1979).

En lo que se refiere a las aves es sobradamente conocida la observación de Schultze, origen de la teoría de la duplicidad, de que las aves nocturnas poseen una retina mucho más rica en basto-

nes que las aves diurnas. Por nuestra parte señalaremos la ausencia total de gotas rojas (conos rojos) en las aves de hábito nocturno y la casi desaparición de las amarillas. De igual forma, y posiblemente como proceso adaptativo a una precisa visión de los colores en las aves diurnas, comprobamos la estratificación de la plexiforme externa, quizás condicionada a la aparición de conos rectos y oblicuos que podríamos suponer relacionados con la visión de colores.

Bien podría suceder que, como consecuencia de la aparición de distintos tipos de fotorreceptores, se diferencien células horizontales conectadas con ellos. En las aves diurnas hemos podido establecer las conexiones que tienen lugar entre los tres tipos de células horizontales descritas : de axon corto y sin axon, tipo I y II, con los distintos tipos de fotorreceptores (FIG. ).

En las aves nocturnas, la plexiforme externa no está estratificada, todos los receptores terminan al mismo nivel y no existen conos rojos. Es de interés señalar que en estas retinas sólo hemos podido demostrar la existencia de células horizontales de axon corto o células en brocha que conectan conos por sus dendritas y bastones por su terminal axónica. No podemos asegurar que no existan células horizontales sin axon, aunque nosotros no las veamos, pero pensamos que al no existir conos rectos rojos no precisan del tipo II de célula horizontal sin axon, que conecta con los conos rectos y oblicuos. Sería más probable la presencia de la célula sin axon tipo I que conecta con conos de la primera capa en las aves diurnas, presentando las aves nocturnas, entonces, una organización de la plexiforme externa análoga a la de los ma-

míferos inferiores. El comprobar esta suposición requiere estudios ulteriores.

A continuación discutiremos únicamente las discrepancias observadas en el presente trabajo con las descripciones de autores anteriores.

En relación con los fotorreceptores y la gota lipídica que contienen, en contra de lo observado por autores anteriores (Meyer y Cooper, 1966; Morris, 1970; Mariani, 1977), incluso de nuestro laboratorio (Gallego y cols., 1975), hemos podido detectar inequívocamente que la gota que contiene el miembro principal del cono doble es de color verdoso y no amarilla, como sistemáticamente se ha venido describiendo. Las observaciones anteriores, erróneas, han sido debidas a la dificultad de identificar los tipos distintos de fotorreceptor y el color de su gota lipídica, en cortes de retina observados con microscopia de luz, mientras que las observaciones con microscopia electrónica no permiten identificar el color de las gotas de los distintos receptores, aunque se pueda establecer una clasificación de los mismos por la densidad electrónica de sus gotas. Por esta razón hemos desarrollado la técnica de aislamiento de los fotorreceptores, que permite identificar los distintos tipos, morfológicamente, y determinar el color de sus gotas lipídicas. Creemos que las pruebas que aportamos son decisivas (FIG. 8).

En relación con los conos dobles existía una descripción de Cajal (1893) (FIG. 9) que se había admitido sin discusión y que nuestros estudios demuestran que era errónea. Según Cajal, en sus preparaciones obtenidas por el método de Golgi, los conos dobles

"Son parejas de elementos en íntimo contacto longitudinal, uno de los cuales es más pequeño que el compañero (cono accesorio). Como nuestras pesquisas pusieron de manifiesto, cada elemento de la pareja representa un conductor individual, pues la varicosidad o pie de la prolongación descendente reside en plano diferente de la zona plexiforme y entra verosímilmente en contacto con una bipolar especial" (Cajal, 1893, p. 67). Como hemos comentado anteriormente, era también difícil precisar el tipo de gota lipídica que contiene el cono principal y si el cono accesorio contiene o no gota lipídica, lo que explica las contradicciones que aparecen en la literatura referentes a estos puntos.

El método de Golgi, usado por Cajal, no permite por supuesto identificar los colores de las gotas lipídicas, pero por otra parte es poco frecuente que tinte simultáneamente los dos componentes del cono doble y, cuando esto sucede, es muy difícil interpretar la imagen obtenida (FIG. 9 y 12), y la tinción por separado de los conos principal y accesorio puede dar lugar a confusión de estos elementos con conos simples. Según nuestra interpretación de los dibujos de Cajal, sus conos dobles (FIG. 9 ) corresponden a conos simples superpuestos, ya que en sus imágenes los núcleos de ambos elementos se encuentran al mismo nivel, en contradicción con las imágenes obtenidas sistemáticamente por nosotros de dos núcleos situados a niveles diferentes. Pero aún hay más, en los dibujos de Cajal se observa como uno de los elementos de sus conos dobles o gemelos presenta en su filamento interno unas pequeñas colaterales, detalle muy característico de los conos oblicuos y que no hemos visto jamás en los conos rectos o dobles. Parece

pues fuera de duda que las imágenes de Cajal de los conos dobles no corresponden al cono principal y al accesorio, sino a un cono que termina en la línea más externa de la capa plexiforme externa, y a un cono oblicuo superpuesto según aparece con la tinción mediante el método de Golgi. Tanto la microscopia de luz como la electrónica, así como el estudio de los conos dobles en preparaciones de fotorreceptores aislados, nos han demostrado que los cuerpos sinápticos de sus dos componentes terminan siempre al mismo nivel, la línea más externa de la capa plexiforme.

Otro hecho, evidente en nuestras preparaciones de fotorreceptores aislados, es que la gota amarilla, que como hemos visto no corresponde al cono principal, se encuentra sistemáticamente en un cono simple con estructura muy parecida al cono simple que contiene la gota roja. Así como la adjudicación de la gota amarilla al cono principal del cono doble ha sido un error, en el que han incurrido y coinciden todos los autores anteriores, en el color de las gotas de los conos simples existen discrepancias entre los mismos (Cuadro pág. 21) : Mariani describe un cono simple con gota naranja (¿amarilla?) y un cono recto con gota roja, mientras que Genis adjudica la gota amarilla al cono oblicuo, y Meyer y Cooper sólo consideran una gota roja para el cono simple y Gallego y cols. una gota roja para el cono recto.

Para nosotros, según las observaciones realizadas con los diversos métodos utilizados, los conos simples pueden ser : rectos y oblicuos, dentro de los estructuralmente caracterizados como conos rectos distinguimos uno con gota roja y otro con gota amarilla, el cono oblicuo presenta siempre una gota de color ver-

doso. El problema que nos plantea el cono recto de gota amarilla es si termina al mismo nivel en la capa plexiforme que el cono recto de gota roja que lo hace al nivel medio de la capa plexiforme.

Ramón y Cajal (1893) señaló que la capa plexiforme externa, en la retina de las gallináceas, estaba formada por tres niveles o "plexus concentricos". El nivel externo se forma por las fibras basilares de los bastones y por los penachos de ciertas bipolares; el nivel intermedio está constituido por las expansiones de los conos rectos y las arborizaciones ascendentes de otro tipo de bipolar; el nivel interno se compone por las fibrillas emanadas de los conos oblicuos y los penachos superiores de otro tipo de bipolares. Mencionaba también las expansiones protoplásmicas ascendentes de las células horizontales, que parecen abrazar los tres pisos de la zona plexiforme externa, y las arborizaciones finales de los axones procedentes de dichas células horizontales. El mismo afirmaba la extrema complejidad de dicha zona en la retina de las aves y creía que este tipo de estructura podía sufrir algunas modificaciones, según los distintos tipos de aves, sobre todo aquéllos que fueran "muy pequeños".

Morris y Shorey (1967), con microscopia electrónica, llegan a la conclusión que los cuerpos sinápticos de los fotorreceptores de la retina de pollo se localizan en dos niveles distintos en la plexiforme externa, en el nivel más escleral se sitúan los cuerpos sinápticos de los conos dobles y de los bastones, en el nivel interno o vitreal se sitúan los cuerpos sinápticos de los conos simples. Ellos no reconocieron más que dos niveles dentro de la



plexiforme externa, sin embargo vieron el cuerpo sináptico del cono oblicuo con microscopia electrónica, si bien no fueron capaces de identificarlo, lo que no es de extrañar, ya que no consideran este tipo de fotorreceptor, en los fotorreceptores de la retina del pollo, como puede comprobarse en la figura del trabajo referido. Según ellos difiere de los cuerpos sinápticos de los fotorreceptores en que está penetrado por "neuritas en su superficie escleral o lateral y no en la vitreal como en los demás fotorreceptores". Esta descripción corresponde precisamente al cuerpo sináptico del cono oblicuo, una de cuyas características, como hemos visto, es que nunca presenta su superficie sináptica perpendicularmente al eje de los fotorreceptores sino girada lateralmente, incluso  $180^{\circ}$ , con la superficie sináptica en este caso dirigida hacia la plexiforme externa. No es raro que Morris y Shorey no llegaran a identificar el cono oblicuo ya que en los antecedentes de descripción de fotorreceptores en la retina de las aves, ignoran el trabajo de Cajal que, como es sabido, fue quien describió este tipo de fotorreceptor.

Gallego y cols. (1975) estudian en la retina de las aves diurnas y nocturnas la plexiforme externa, con el método de Golgi y con M.E. Comprueban en las aves diurnas la estratificación en tres niveles de la plexiforme externa, tal como describió Cajal. Sin embargo observan que el nivel superior lo forman los cuerpos sinápticos de los bastones y conos dobles, piensan también que hay un tipo de cono simple situado en este nivel, pero no tienen suficiente evidencia para asegurarlo. El nivel medio está ocupado por los cuerpos sinápticos de los conos rectos. El nivel interno

está constituido por los cuerpos sinápticos de los conos oblicuos, que se hallan entremezclados con los somas de las células horizontales, los cuales se sitúan en la fila más externa de la capa de granos internos y señalan también la disposición lateral o invertida de los cuerpos sinápticos de los conos oblicuos.

En el mochuelo, la plexiforme externa no se encuentra estratificada; dichas aves carecen de conos rectos con gota roja y conos oblicuos, los cuerpos sinápticos de sus fotorreceptores (bastones, conos dobles y conos simples) se sitúan todos al mismo nivel. Según Gallego (1975) este fenómeno se debe a la gran cantidad de bastones presentes en las retinas de las aves nocturnas, a la presencia de muy pocos conos dobles y conos simples.

Los contactos entre fotorreceptores pueden tener significación funcional de interés. Según nuestros estudios, tienen lugar a nivel del segmento interno, por encima de la limitante externa, en forma de contactos desmosómicos entre las vellosidades de receptores próximos. Este tipo de vellosidades fueron llamadas "proyecciones en rueda dentada" por Yasuzumi y cols. (1958), "pliegues" por Yamada e Ishikawa (1967), "crestas en rueda dentada" por Cohen (1963) y "aletas laterales" por Pedler y Tansley (1963). Estas prolongaciones citoplásmicas de los fotorreceptores no se han encontrado en la retina de los vertebrados inferiores. El hecho de encontrarlas en retinas avasculares y no en retinas vascularizadas ha permitido relacionar su función con el transporte de agua y metabolitos (Yamada, 1960), (Dartnell y Tansley, 1963), (Dunn, 1966). A nivel de los cuerpos sinápticos los dos tipos de contactos descritos por nosotros lo habían sido en otras especies

por diversos autores. Sjostrand (1958-59) describió en la retina del cobaya contactos entre cuerpos sinápticos de conos y entre el cuerpo sináptico de un bastón con el cono. En la retina humana Missotten (1963-65) describe este tipo de contactos, tanto entre conos con conos como conos con bastones. El contacto de tipo invaginiante fue descrito inicialmente por Gallego (1971) en la retina del conejo, observando como el filamento basilar de un cono penetraba dentro de la triada de un bastón; posteriormente (1975 c), lo describió en la retina del gato.

En la tortuga, Lasansky (1971) describió este tipo de contactos y vió como el filamento basilar de un cono penetraba en la triada de otro cono; posteriormente (1974), precisó que el filamento basilar del cono era el componente central de la triada de otro cono vecino. En la salamandra, Lasansky (1973) describe que los filamentos basilares de los conos forman los componentes laterales de las triadas de bastones y los filamentos basilares de los bastones penetran en las triadas de conos. En todo caso, la descripción de Lasansky, como siendo el filamento de otro receptor el que forma el elemento central de la triada, podría ser una excepción ya que, por otra parte, Gayoso (1975), igual que nosotros, encuentra los filamentos basilares que se invaginan en otro cuerpo sináptico formando siempre el componente lateral de la triada.

Los contactos de tipo desmosómico entre los cuerpos sinápticos de conos y de conos con bastones son una regla, muy abundantes, en la retina de los primates (Alvarez, 1982).

En relación con el desarrollo embrionario de los fotorrecep

tores y células horizontales consideramos que una célula ventricular se va a diferenciar en un fotorreceptor cuando empieza a emitir filamentos, lo que ocurre según nuestras observaciones a partir del día 7 de incubación. Antes de esta fase no se pueden diferenciar, mediante el método de Golgi-Stensaas, las células ventriculares que van a dar lugar a los neuroblastos que dan origen a los fotorreceptores, si bien han de ser elementos celulares que permanecen unidos a la línea ventricular (FIG. 24).

Según Prada y cols. (1981-82), a cuyos estudios nos referimos para el desarrollo y diferenciación de los fotorreceptores en fases anteriores del desarrollo embrionario, es a partir del día 5 ó 5,5 cuando se distinguen dos nuevas poblaciones de neuroblastos : los de amacrinas y los de fotorreceptores : "Los precursores de las células amacrinas abandonan el ciclo celular inicialmente en la fase  $G_1$ , al desprenderse de la línea ventricular y emigrar hacia la futura capa de células amacrinas. Los fotorreceptores parecen derivar de las células ventriculares en sus estadios, bien premitótico tardío ( $G_2$ ) o postmitótico inicial ( $G_1$ ), que se transforman en fotorreceptores sin desprenderse de la línea ventricular".

Prada y cols. (1982) caracterizan como "supuestos" neuroblastos de fotorreceptores, señalados con interrogación en sus dibujos, a células unidas a la línea ventricular, que en vez del aspecto redondeado que presentan en los días 2,5 a 3,5 de incubación comienzan a deformarse, alargándose en los días 5,5 y 6, pero sin presentar filamentos hasta el día 7, 7,5 que es precisamente el momento de diferenciación inicial e inequívoca que nosotros

hemos comprobado.

Prada distingue, en el día 7, una población celular unida a la línea ventricular, con formas diferentes y en distintos estados de formación de procesos que pueden, según ella, transformarse en fotorreceptores, amacrinas y horizontales. En nuestra opinión, si bien no podemos excluir por completo el que las células horizontales derivan de la familia de neuroblastos, unidos a la línea ventricular que da origen a los fotorreceptores, tal como supone Prada, nuestras observaciones nos llevan a considerar que más bien proceden de neuroblastos que, desprendidos de la línea ventricular, darían origen tanto a las células horizontales como a las amacrinas.

Pensamos que esta población celular unida a la línea ventricular que distingue Prada el día 7 no puede dar origen a amacrinas y horizontales, pues el día 7 encontramos ya amacrinas perfectamente diferenciadas y situadas a nivel de la plexiforme interna. Además observamos, ya en los días 5,5 y 6 en nuestras preparaciones, y en el 6 según los dibujos de Prada, las primeras células sospechosas de transformarse en amacrinas situadas a nivel del tercio vitreal de la retina. Es muy difícil admitir por lo tanto que de estas células ventriculares sin filamentos, que no hemos visto situadas en capas intermedias de la retina, ni otros autores tampoco, con anterioridad al día 5 pudieran derivar estas células amacrinas. Antes bien nos inclinamos por la tesis que supone que las células amacrinas derivan de neuroblastos desprendidos de la línea ventricular entre los días 5 y 6, y se transforman en esta célula un poco más primitiva dibujada por Prada. Di-

cha célula, entre los días 6 y 7, se desplaza más vitrealmente al tiempo que ya adquiere inequívocamente la forma de una célula amacrina, si bien con un tallo todavía muy robusto y con pocos procesos celulares.

Creemos que los fotorreceptores, como señalamos anteriormente, derivan de neuroblastos que, sin desprenderse de la línea ventricular, empiezan a emitir filamentos y se diferencian en los días sucesivos.

Las amacrinas y horizontales derivarían de otro tipo de neuroblasto que se desprende de la línea ventricular el día 5 ó 6, primero se diferenciarían las amacrinas, claramente identificables el día 7, pero en las que persiste, en algunas de ellas, una prolongación de diversa longitud dirigida hacia la zona escleral de la retina; este filamento escleral se sigue viendo en retinas de 8 y 8,5 días, desapareciendo el día 10, momento en que las células amacrinas adquieren su forma definitiva, monopolar con una sola arborización.

Las horizontales creemos que derivan del mismo neuroblasto que da origen a las amacrinas, pero empieza a diferenciarse más tardíamente, hacia el día 7. Este neuroblasto deja de tener la forma bipolar y se convierte en una célula con un soma casi ovalado, del que parten finos filamentos que tienden a polarizarse, tanto en dirección escleral como vitreal, localizándose en el tercio vitreal de la retina entre las amacrinas. Es de señalar que, en el momento que estos elementos celulares provistos de filamentos se observan con claridad (día 7-7,5), los corpúsculos ventriculares están comenzando a emitir filamentos muchos más pequeños

y tenues que los de las células anteriores. Estos elementos, sospechosos de ser precursores de horizontales, se observan, además de en el tercio vitreal, en el tercio medio el día 7,5 y en días sucesivos más cerca de la plexiforme externa. En los días 8 y 8,5 se encuentran en el tercio vitreal, nivel medio, y muy claramente situados en la plexiforme externa. A partir del día 10 ya no encontramos células de este tipo en los tercios vitreal y medio de la retina, sino todas ellas en las proximidades de la plexiforme externa, donde comienzan a adquirir el aspecto de célula horizontal, al orientarse fundamentalmente hacia los fotorreceptores los filamentos que parten del soma. Las células horizontales se ven claramente diferenciadas el día 11, si bien todavía se observan células indiferenciadas con filamentos dirigidos en todas direcciones. El día 12 hemos observado, al lado de células horizontales en las que todavía no hemos podido detectar el axon, elementos que poseen un soma de célula horizontal, conservando algunos filamentos desorientados, dirigidos incluso hacia la zona vitreal de la retina. Cuando aparecen las células horizontales ya perfectamente diferenciadas es el día 13, con su soma y tallo, de donde parte el árbol dendrítico formado por filamentos y procesos tan cortos y compactos que hacen muy difícil su clasificación, adquiriendo el aspecto de "brocha" o "cepillo". Es a partir de esta célula horizontal primitiva de donde van a derivar los tres tipos de células horizontales de la retina del pollo. A partir del día 14 algunas de estas células aparecen con el comienzo del axon. No hemos podido determinar si en estos momentos la terminal axónica está ya o no formada, las primeras terminales bien diferenciadas

las hemos comprobado el día 16. A partir de este momento nuestras observaciones sobre el desarrollo del axon y terminal axónica son superponibles a las descripciones de Gallego (1980) y Genis-Gálvez y cols. (1980).

El problema de diferenciación de los tres tipos de células horizontales es difícil de resolver, con seguridad nosotros hemos podido comprobar la presencia de los tres tipos a partir del día 17. Con toda probabilidad las células horizontales que hemos visto sin axon el día 13, pueden seguir tres líneas de diferenciación, simultáneamente con la diferenciación de los fotorreceptores. Las líneas de diferenciación son, por un lado células de axon corto y, por otro, las células sin axon de tipo I y tipo II. Es de señalar que en el momento en que empieza a parecer la célula en brocha o de axon corto, es el momento en que aparecen las gotas lipídicas en los fotorreceptores y estos empiezan a diferenciarse. Podíamos suponer que la maduración de los fotorreceptores con la aparición de las gotas lipídicas pudiera inducir también la diferenciación de los tres tipos de células horizontales. El hecho objetivo es que, a partir del día 17, los tres tipos de horizontales están claramente diferenciados.

La tesis del origen de las células horizontales a partir de una célula primitiva derivada del neuroblasto, que va a dar origen también a las células amacrinas, no ha sido expuesta con anterioridad. Creemos que los datos morfológicos que hemos aportado son suficientes para permitirnos suponer este origen, que por otra parte y desde un punto de vista funcional, parecería un proceso lógico por dos razones : en primer lugar las células amacri-



nas y células horizontales se desarrollan y se instalan en sus sitios respectivos en la retina una vez que comienzan a formarse las capas plexiformes; como la capa plexiforme interna empieza a desarrollarse con anterioridad a la externa, son también las células amacrinas las que comienzan su diferenciación inicialmente. Una vez empiezan a formar los fotorreceptores con cuerpos sinápticos bien diferenciados, a partir del día 8,5, comienza la diferenciación de las células horizontales a partir de la célula primitiva que ha emigrado hasta la capa de fotorreceptores. Parece lógica la diferenciación de amacrinas y horizontales partiendo del mismo origen, si tenemos en cuenta la significación funcional de ambos tipos celulares, que forman sistemas de asociación transversal de las vías centrípetas, posiblemente regulando o modulando su funcionamiento.

En apoyo de la tesis del origen de las horizontales a par-tir de una célula que emigra desde el tercio vitreal de la retina hacia la capa plexiforme externa cuando ya están formadas las cé-lulas amacrinas, tenemos la aportación de Cajal (1919) quien, en su estudio sobre la desorientación inicial de las neuronas reti-nianas de axon corto, demuestra en el ratón que, inicialmente, las células horizontales están situadas en el seno de la capa granulosa interna mostrando un axon tortuoso y muy corto. En días sucesivos se sitúan a nivel de la plexiforme externa y su axon ad-quiere trayecto horizontal definitivo.

Los datos más recientes demuestran que las células amacri-nas, y concretamente las de la retina del pollo, contienen encefá-linas y otros neuropéptidos, habiendo incluso datos de que cada

uno de los 4 ó 5 tipos de amacrinas descritos contiene un neuropéptido diferente. A nivel de las horizontales se desconoce si contienen o no neuropéptidos, pero todo hace suponer que posiblemente los contengan, y si esto es así podrán deducirse conclusiones de indudable interés funcional.

## CONCLUSIONES

- 1 - La retina de las aves muestra peculiaridades estructurales características diferentes de la de los mamíferos. A su vez, a nivel de la primera sinapsis de la vía visual, las aves nocturnas y diurnas presentan claras diferencias estructurales y de organización.
- 2 - La capa plexiforme externa, en las aves diurnas, está estratificada en tres niveles de situación de los cuerpos sinápticos de los fotorreceptores, mientras que en las aves nocturnas los cuerpos sinápticos de los fotorreceptores se sitúan en un nivel único.
- 3 - Los fotorreceptores de las aves diurnas (pollo) y las gotas lipídicas que contienen han sido estudiadas en retinas embrionarias y de animales jóvenes y adultos, llegando a determinar :
  - a) Los fotorreceptores comienzan a diferenciarse a partir del día 7 de incubación.
  - b) Derivan de una célula primitiva que pasa por la fase de neuroblasto, permaneciendo unido a la línea ventricular.
  - c) Las gotas lipídicas, inicialmente pequeñas e incoloras, se detectan a partir del día 13 de incubación.
  - d) Entre los días 15 y 16 aparecen ya las gotas coloreadas en

amarillo, rojo y verde.

- e) A partir del día 16 se diferencian los bastones, conos dobles, conos rectos y oblicuos.
- f) El miembro principal del cono doble posee una gota verdosa lo mismo que el accesorio, si bien ésta de menor tamaño. El cono oblicuo posee también una gota de color verdoso y se han detectado dos conos rectos, uno con gota roja y otro con gota amarilla.
- g) El área roja de la retina de la paloma se caracteriza por poseer conos con gota roja repletos, en su segmento interno, de microgotas también rojas. Es este hecho y no el mayor número de conos rojos, lo que da a esta zona el color rojo difuso que la caracteriza.
- h) En la retina adulta existen :
- bastones sin gota lipídica, cuyo cuerpo sináptico se sitúa en el estrato más externo de la capa plexiforme externa;
  - conos dobles que poseen ambos, el miembro principal y accesorio, gota de color verdoso; los cuerpos sinápticos terminan los dos al mismo nivel en la zona más externa de la plexiforme externa;
  - conos rectos con gota lipídica roja; su cuerpo sináptico termina en el nivel medio de la plexiforme externa;
  - conos rectos con gota lipídica amarilla. No hemos podido precisar con exactitud la localización de su cuerpo sináptico, pudiendo corresponder a un tipo de cono simple



que hemos detectado, cuyo cuerpo sináptico se localiza en el nivel más escleral de la plexiforme externa;

- conos oblicuos, con gota verde, cuyo cuerpo sináptico se localiza en el nivel más interno de la plexiforme externa.

4 - Las aves nocturnas carecen de conos oblicuos y conos rectos de gota roja. Poseen abundantes bastones, conos dobles con gota verdosa o incolora y muy escasa cantidad de conos con gota lipídica amarilla. Los cuerpos sinápticos de estos fotorreceptores terminan, en el mochuelo y la lechuza, al mismo nivel, en un estrato único de la capa plexiforme externa.

5 - Hemos distinguido en la retina de las aves tres tipos de células horizontales :

- a) Una célula horizontal de axon corto, con un axon cuya longitud es de 200 a 400 micras, y una terminal axónica con aspecto de palmera, provista de pequeños botones terminales.
- b) Una célula horizontal sin axon de tipo I, que ha sido descrita anteriormente con los nombres de célula bipeñachada o en candelabro.
- c) Una célula horizontal sin axon de tipo II, descrita también como célula estrellada, y claramente distinta de la anterior por la disposición de sus procesos celulares y finas ramas terminales.

d) En las aves nocturnas hemos podido detectar únicamente la presencia de la célula horizontal con axon, con una longitud de éste de 600 a 800 micras, cuya terminal axónica es mayor que la de las aves diurnas y se asemeja mucho a las terminales axónicas de los mamíferos inferiores.

e) Las células horizontales derivan de un neuroblasto, del que derivan también las células amacrinas, localizado en el tercio vitreal de la retina el día 7 de incubación. En días sucesivos va emigrando hacia la plexiforme externa al tiempo que el soma y dendritas adquieren la morfología de una célula horizontal en brocha, sin axon. De esta célula primitiva parecen derivar los tres tipos de células horizontales. La célula de axon corto es la primera en diferenciarse, ya que podemos detectar el comienzo del axon el día 14, y el día 16 se constata la presencia de terminales axónicas. El día 17 se observan claramente diferenciadas las células sin axon tipo I y II.

#### 6 - Los contactos entre fotorreceptores y células horizontales

que pueden tener significación funcional son los siguientes :

a) Contactos entre fotorreceptores, que pueden ser de dos tipos :

- contactos tipo desmosómico, detectados entre las vellosidades del segmento interno de los fotorreceptores, así como entre sus cuerpos sinápticos y los filamentos de los mismos;

- contactos de tipo invaginante, formados por el filamento basilar de un receptor que penetra en el complejo sináptico de otro receptor adyacente.
- b) Contactos entre células horizontales : no existen entre los somas o dendritas de las células horizontales de axon corto. Sin embargo, hemos detectado abundantes contactos tipo desmosómico entre las terminales axónicas de este tipo celular. La existencia de numerosos contactos entre los procesos de la capa plexiforme externa, no fácilmente identificables, nos hace suponer que quizás pertenezcan a las células sin axon.
- c) Contactos entre células horizontales y fotorreceptores :
  - las dendritas de la célula horizontal de axon forman el componente lateral de las triadas en los conos dobles, rectos y oblicuos y las terminales axónicas, penetran en el complejo sináptico de los bastones y, quizás en menor proporción, en los conos de la primera capa de la plexiforme externa;
  - los procesos de las células horizontales sin axon tipo I penetran en el complejo sináptico de los conos situados en el nivel más escleral o externo de la capa plexiforme externa, esto es, conos dobles y quizás algún cono simple;
  - los procesos celulares terminales de la célula horizontal sin axon tipo II penetran en las triadas de los conos rectos y oblicuos.

- 7 - En un estudio preliminar, que necesita ser ampliado, se han detectado por lo menos 5 tipos de células bipolares : 2 tipos individuales para conos, 1 tipo para conos, que debe contactar con más de tres receptores, y 2 tipos de bipolares para bastones. La comprobación de sus conexiones necesita ser llevada a cabo con la técnica Golgi-M.E., estudio que será continuación de esta tesis doctoral.



## B I B L I O G R A F I A

### ALVAREZ MANZANERO, J., 1982

*Fotorreceptores y células horizontales de la retina del mono.*

*Tesis Doctoral. Univ. Complutense. Madrid.*

### ARMENGOL, J.A., PRADA, F. Y GENIS-GALVEZ, J.M., 1979

*Gotas de grasa de los fotorreceptores de la retina del pollo : un posible mecanismo de génesis.*

*Morf. Normal y Patológica. Secc. A. 3, 725-735.*

### BALBUENA, F.F., 1922

*Nota previa : Una fórmula para la aplicación del método de Cajal a los cortes de retina.*

*Trab. Lab. Invest. Biol. Univ. Madrid, 20, 31-39.*

### BALBUENA, F.F., 1936

*Conexiones de los conos y bastones a nivel de la capa plexiforme externa.*

*Arch. de Oftal. Hisp. Amer., 35, 337.*

### BARON M. Y GALLEGO A. 1982

*The horizontal cells of the falconidae retina*

*En "The structure of the eye". Ed. J.Hollyfield (165-173)*

### BOWMAKER, J.K. Y KNOWLES, A., 1976

*The visual pigments and oil droplets of the chicken retina.*

*Vis. Research, 17, 755-764.*

### BOWMAN, W., 1849

*Lectures on the parts concerned in the operations on the eye, and on the structure of the retina.*

*Delivered at the Roy. London Ophtalmic Hospital Moonfields, june 1947, Longman, Brown, Green and Longmans. Londres.*

### BIDDER, F., 1839

*Zur Anatomie der Retina, insbesondere zur Würdigung der Stabformigen Körper in*

derselben.

Arch. f. Anat. Physiol. u. Wiss. Med. (J. Muller), 371.

BRUCKE, E., 1844

*Ueber die physiologische Bedeutung der Stabformigen Korper und der Zwillings-  
sapten in den Augen der Wirbelthiere.*

Arch. f. Anat. Physiol. u. Wiss. Med. (J. Muller), 444.

CAJAL, S.R., 1888

*Estructura de los centros nerviosos de las aves.*

Rev. Trim. Micrográfica. Madrid.

CAJAL, S.R., 1893

*La retine des vertébrés.*

*La Cellule, 9, 119-225.*

CAJAL, S.R., 1904

*Textura del sistema nervioso del hombre y los vertebrados.*

Ed. Moya. Madrid.

CAJAL, S.R., 1919

*La desorientación inicial de las neuronas retinianas de axon corto.*

Trab. del Lab. Invest. Biol. Univ. Madrid, 17, 65-86.

CAJAL, S.R., 1933

*Los problemas histiofisiológicos de la retina.*

XIV Concilium ophthalmologicum, 1933, Madrid.

CARASSO, N., 1956

*Mise en évidence de prolongements cytoplasmiques infra-microscopiques au niveau  
du segment interne des cellules visuelles du Gecko (Reptile).*

C. R. Acad. Sci. Paris, 242, 2988-2991.

CARASSO, N., 1957

*Ultrastructure des cellules visuelles du Gecko.*

En "Electron Microscopy". Proc. Stockhoem. Conf. Eds. F. S. Sjöstrand and J. Rhodin. Acad. Press, N. Y., 192-194.

CARASSO, N., 1958

Ultrastructure des cellules visuelles de larves d'amphibiens.  
C. R. Acad. Sci. Paris, 247, 527-531.

COHEN, A.I., 1963

The fine structure of the visual receptors of the pigeon.  
Exp. Eye Res., 2, 88-97.

CORTI, A., 1850

Beitrag zur Anatomie der Retina.  
Arch. f. Anat. Physiol. u. Wiss. Med. (J. Muller), 273.

CRESCITELLI, F., 1972

The Visual cells and visual Pigments of the vertebrate Eye.  
Handbook of Sensory Physiology, VII/1, 247-351.

DARTNALL, H.S.A. Y TANSLEY, K., 1963

Physiology of vision : retinal structure and visual pigments.  
Ann. Rev. Physiol., 25, 433.

DOGIEL, A., 1888

Ueber das Verhalten, der nervösen Elemente in der Retina der Ganodien, Reptilien, Vögel und Säugetiere.  
Anat. Anzeiger, III, 133.

DOGIEL, A., 1891

Ueber die nervösen Elemente der Retina des Menschen.  
Arch. f. Mikrosk. Anatomik. 38, 317.

DOWLING, J.E., BROWN, J.E. Y MAJOR, D., 1966

Synapses of horizontal cells in rabbit and cat retinas.  
Science, N.Y., 153, 1639-1641.

DUNN, R.F., 1966

*Studies on the retina of the gecko, coleonyx variegatus.*

*I. the visual cell classification.*

*J. Ultrastructure. Res.*, 16, 651-671.

EHRENBERG, C.G., 1833

*Nothwendigkeit einer feineren mechanischen Zerlegung des Gehirns und der Nerven vor der Chemischen, dargestellt aus Beobachtungen.*

*Ann. d. Physik u Chemie (Poggendorff)*, 28 (104), 449.

ERLICH, P., 1886

*Über die Methylenblaureaction der Lebendes Nervensubstanz.*

*Deutsche. Med. Wochenschr. 12th year*, 49, and *Biol. Centralbe*, 6, 214.

FISHER, S.K. Y BOYCOTT, B.B., 1974

*Synaptic connexions made by horizontal cells within the outer plexiform layer of the retine of the cat and the rabbit.*

*Proc. R. Soc. London*, 186 B, 171-176.

FONTANA, F., 1782

*Treatise on the venom of the viper; on the american poisons; and on the cherry laurel, and some other vegetable poisons. To wich are annexed observations on the primitive structure of the animal body; different experiments on the reproduction of the nerves; and a description of a new canal of the eye.*

*2 d. ed. 2 v. Cutnhell, Londres.*

FORTIN, E.P., 1926

*Investigations Histologiques sur certains éléments de la rétine.*

*Cpt. Rend. Acad. Sci. Paris*, 183, 452.

FORTIN, E.P., 1930

*Falsedad de las concepciones actuales de la retina. Crítica del método de Golgi-Cajal.*

*Arch. de Oftalm. de Buenos Aires*, 5, 301.

GALLEGO, A., 1953

*Procedimiento de impregnación argéntica de la retina entera.*

*An. Farm. Esp.*, II, 171-176.

GALLEGO, A., 1964

*Description d'une nouvelle couche cellulaire dans la rétine des mammifères et son rôle fonctionnel possible.*

*Bull. Ass. Anat.*, 49, 624-631.

GALLEGO, A., 1965

*Connexions transversales au niveau des couches plexiformes de la rétine.*

*Actualités neurophysiologiques. Ser. 6*, 5-27. Paris : Masson.

GALLEGO, A., 1971

*Horizontal and amacrine cells in the mammal's retina.*

*Vision Res. Suppl.* 3, 11, 33-50.

GALLEGO, A., 1975

*Las células horizontales de la retina de los vertebrados.*

Real Academia Nacional de Medicina. Instituto de España. Madrid.

GALLEGO, A., 1976

*Comparative study of the horizontal cells in the vertebrate retina : mammal's and birds.*

*Neural Prinp. in vision. Ed. By Springer Verlag, Berlín. Heidelberg.*

GALLEGO, A., 1977

*Participación de las células horizontales y amacrinas en el procesamiento de la información visual : correlación morfológica y electrofisiológica.*

*Neurobiología, Fund. Juan March. S. Univ. Madrid.*

GALLEGO, A., 1978

*Mecanismos neurales de adaptación visual a nivel de la capa plexiforme externa*

de la retina.

S. Univ. Fundación Juan March. Madrid.

GALLEGO, A., 1979

*Estructura funcional de la retina de los Selacios. Fotorreceptores y células horizontales.*

*Morf. Normal y Patológica. Secc. A, 3, 313-334.*

GALLEGO, A., 1980

*Organization of the outer plexiform layer of the tetrapods retina.*

*IV Symposium on the structure of the Eye, México, 1980 (Hollyfield Elsevier North Holland, eds.) (in press).*

GALLEGO, A. Y PEREZ ARROYO, M., 1976

*Photoreceptors and horizontal cells of the turtle retina.*

*The Estructure of the Eye, III. Eats. Yamada and Mishima, 311-317.*

GALLEGO, A. Y SOBRINO, S.A., 1975

*Short-axon horizontal cells of the monkey's retina.*

*Vision. Res., 1, 747-748.*

GALLEGO, A., BARON, M. Y GAYOSO, M., 1975

*Organization of the outer plexiform layer of the diurnal and nocturnal bird retina.*

*Vis. Research, 15, 1027.*

GALLEGO, A., BARON, M. Y GAYOSO, M., 1975 b

*Horizontals cells of the avian retina.*

*Vision. Res., 15, 1029-1030.*

GAYOSO, M., 1975

*Fotorreceptores de la retina de los vertebrados.*

*Tesis Doctoral. Univ. Granada*

GENIS-GALVEZ, J.M., PRADA, F., Y ARMENGOL, J.A., 1979

*Evidence of three types of horizontal cells in the chicken retina.*

*J. J. Ophthalmol.*, 23, 378-387.

GENIS-GALVEZ, J.M., GARCIA-LOMAS, V., PRADA, F. Y ARMENGOL, J.A.,

1980

*Developmental study of axon formation in the horizontal neurons of the chick embryo.*

*(En prensa).*

GRUNER, 1930

*A treatise on the Canon of Medicine of Avicenna incorporating a translation of the first book.*

*Luzac and Co. Londres.*

HANNOVER, A., 1840

*Üeber des Netzhaut und ihre Gehirnsubstanz, bei Wirbelthieren, mit Ausnahme des Menschen.*

*Arch. Anat. Physiol.*, 320-345.

HANNOVER, A., 1854

*Zur Anatomie und Physiologie der Retina.*

*Zeits. f. Wiss. Zool.*, 5, 17.

KOLB, H., 1970

*Organisation of the outer plexiform layer of the primate retina : Electron microscopy of the Golgi-impregnated cells.*

*Phil. Trans. Roy. Soc. Lond.*, B. 258, 261-283.

KOLB, H., 1974

*The connections between horizontal cells and photoreceptors in the retina of the cat. Electron Microscopy of Golgi Preparations.*

*J. Comp. Neurol.*, 155, 1-14.

KÖLLIKER, A., 1854

*Mikroskopische Anatomie oder, Gewebelehre des Menschen.*

*Nervenhaut, Retina*, 3, 648, W. Engelmann, Leipzig.

KÖLLIKER, A. Y MÜLLER, H., 1852

*Zur Anatomie und Physiologie der Retina.*

*Verhandl. d. Physik-Med. Gesellschaft Würzburg*, 3, 316-336.

LASANSKY, A., 1971

*Synaptic organization of cone cells in the turtle retina.*

*Phil. Trans. Roy. Soc. B.* 262, 365-381.

LASANSKY, A., 1973

*Organisation of the outer synaptic layer in the retina of the larval tiger salamander.*

*Phil. Trans. Roy. Soc.*, 265, 471-489.

LASANSKY, A., 1974

*Synaptic actions on retinal photoreceptors : structural aspects.*

*Fed. Proc.*, 33, 1069-1073.

LEICESTER, J. Y STONE, J., 1967

*Ganglion, amacrine and horizontal cells of the cat's retina.*

*Vision Res.*, 7, 695-705.

MALPIGIO, M., 1664

*Marcelli Malpighii Exercitatio Epistolica de cerebro.*

*En Malpighii opera omnia*, 2, 113.

MARIANI, A.P. Y LEURE-DUPREE, E.A., 1977

*Horizontal cells of the pigeon retina.*

*The Journal of Comparative Neurology*, 175, n° 1.

MARIANI, A.P. Y LEURE-DUPREE, A., 1978

*Photoreceptors and oil droplets colors in the red area of the pigeon retina.*



*J. of Comp. Neurol.*, 182, nº 4, 821-838.

MERKEL, F., 1877

*Die Menschliche Retina.*

*Klin. Monatsbl. f. Augenheilk.*, 15, 205.

MEYER, D.B. Y COOPER, T.G., 1966

*The visual cells of the chicken as revealed by phase contrast microscopy.*

*Am. H. Anat.*, 118, 723-734.

MEYERHOF, M., 1928

*The book of the ten Treatise on the Eye.*

Atribuido a Hunain Ibn Ishak (809-877) d.c. Traducción inglesa de los dos manuscritos conocidos. Prensa del Gobierno. El Cairo.

MISSOTTEN, L., 1963

*L'ultrastructure des cônes de la rétine humaine.*

*Bull. Soc. Belge Ophthal.*, 132, 472-502.

MISSOTEN, L., 1965

*The ultrastructure of the human retina.*

Bruxelles : Ediciones Arscia, S.A.

MORRIS, V.B., 1970

*Symmetry in a receptor mosaic demonstrated in the chick from the frecuencies, spacing and arrangement of the types of retinal receptor.*

*J. Comp. Neurol.*, 140, 359-398.

MORRIS, V.B. Y SHOREY, C.D., 1967

*And electron Microscope study of types of receptor in the chick retina.*

*J. of Comp. Neurology*, 129, 313-340.

MÜLLER, H., 1851

*Zur Histologie der Netzhaut.*

*Zeits. f. Wiss. Zool.*, 3, 234.

MÜLLER, H., 1857

*Anatomisch-Physiologische Untersuchungen über die Retina des Menschen und der Wirbelthiere.*

*Zeits. f. Wiss. Zool.*, 8, I.

PACINI, F., 1845

*Nuove ricerche microscopiche sulla tessitura intima della retina nell'uomo, nei vertebrati, nei cefalopodi e negli insetti, procedute da alcune riflessioni sugli elementi morfologici globulari del sistema nervoso.*

*Memoria di Fillipo Pacini di Pistoja, con tavola. Nuovi Ann. d. Sci. Natur. e Randic. d. Sess. Soc. Agrar. ed. Accad. Sci. d. Istit. di Bologna.*

PEDLER, C. Y TANSLEY, K., 1963

*The fine structure of the cone of a diurnal gecko (Phelsuma innotata).*

*Exp. Eye. Res.*, 2, 39-47.

PLEHN, F., 1922

*Traducción de J. Kepler : Grundlagen der geometrischen Optik (im Anschluss an die Optik des Witelo).*

*Ed. por M. V. Rohr, nº 198. Akademische Verlagsgesellschaft. M.B.H. Leipzig.*

POLYAK, J.L., 1941

*The retina.*

*University of Chicago Press, Chicago.*

PRADA, C., PUELLES, L. Y GENIS-GALVEZ, J.M., 1981

*A Golgi Study on the Early Sequence of Differentiation of Ganglion Cells, in the Chick Embryo Retina.*

*Anat. Embryol.*, 161, 305-317.

PRADA, C. Y RAMIREZ, G., 1982

*A Golgi Study of the cell cycle and early neuron and glia differentiation in the chick retina.*

*Symposium internacional "Cajal" : Horizons in Neuroscience, Valencia. (In press).*

PRIESTLY, 1772

*The History and present state of Discoveries relating to vision, light and colours.*

*By Joseph Priestly, LL.D.F.R.S. Facta est immensi copia mundi ovid, Londres Printed por J. Johnson, nº 72, St. Paul's Church-Yard.*

RAOF, H.E., 1929

*The absorption of light by the coloured globules in the retina of the domestic hen.*

*Proc. Roy. Soc. Londres, 371-374.*

REDSLOB, E., 1939

*Histologie de la rétine.*

*En Traité d'ophtalmologie, I, 409-493, Masson, Paris.*

REMAK, R., 1854

*Über den Bau der Retina und der Ganglien.*

*Deutsche Klin., 6, 177.*

REPERANT, J. Y GALLEGÓ, A., 1967

*Fibres centrifuges dans la rétine humaine.*

*Archives d'Anatomie microscopique, 65, 2, 103-120.*

RUELLE, E., 1879

*Traducción de las obras de Rufus de Efeso "Denomination des pars du corps humain".*

*Imprenta de Paris, 1879.*

SCHIEFERDEKER, P., 1886

*Studien zur vergleichenden Histologie der Retina.*

*Arch. f. Mikrosk. Anat., 28, 305-396.*

SCHULTZE, M., 1866

*Zur Anatomie und Physiologie der Retina.*

*Arch. f. Mikrosk. Anat.*, 2, 165-175.

SCHULTZE, M., 1867

*Über Stäbchen und Zapfen der Retina.*

*Arch. Mikr. Anat.*, 3, 215.

SCHULTZE, M., 1872

*Sehorgan I Die Retina .*

*En Stricker (ed.) Handb. d. Lehre. d. Geweben. d. Menschen. v. v. Thiere*, 2, 977.

SCHWALBE, G., 1874

*Mikroskopische Anatomie des Sehnerven, der Netzhaut und des Glaskorpers.*

*In, Graefe und Saemisch, Handb. d. Ges. Augenheilk, its ed.*, I, 321.

SJÖSTRAND, F.S., 1958

*Ultrastructure of retinal rod synapses of the guinea pig eye as revealed by three dimensional reconstructions from serial sections.*

*J. Ultrastruc. Res.*, 2, 122-170.

SJÖSTRAND, F.S., 1959

*The ultrastructure of the retinal receptors of the vertebrate eye.*

*Exptl. Biol.*, 21, 128-160.

SJÖSTRAND, F.S., 1961

*Electron microscopy of the retina.*

*The structure of the eye.* Ed. G.K. Smelser Acad. Press. New York, 1, 28.

SOBRINO, J.A. Y GALLEGOS, A., 1970

*Células amacrinas de la capa plexiforme externa de la retina.*

*XII Reunión Nacional de la Soc. Esp. de Ciencias Fisiológicas*, XII, 373.

STROTHER, G.K., 1963

*Absorption spectra of retinal oil globules in turkey turtle and pigeon.*

*Exp. Cell. Res.*, 349-355.

SUDHOFF, K., 1907

*Augen-anatomiebilder im 15 und 16 Jahrhundert.*

*En Sudhoff ed., Studien z. Gesch. d. Med.*, 19. J. A. Barth, Leipzig.

TARTUFERI, F., 1887

*Sull'Anatomia della retina.*

*Arch. per le Sci. Med.*, II, 335 and *Intenat. Monatss. f. Anat. y Physiol*, 4, 421.

TELLO, J.F., 1935

*Cajal y su labor histológica.*

*Univ. Central (cátedra de Valdecilla). Madrid.*

TREVIRANUS, G.R., 1835

*Beitrage zur Aufklarung der Erscheinunge und Gesetze des organischen.*

*Lebens*, I, 41. J.G. Heyse, Bremen.

YAMADA, E., 1960

*Observations on the fine structure of photoreceptive elements in the vertebrate eye.*

*J. Electron Microscopy*, Tokyo, 9, 1-14.

YAMADA, E. E ISHIKAWA, T., 1967

*The so-called "synaptic Ribbon" in the inner segments of the lamprey retina.*  
(cit. por GAYOSO, 1975).

YASUZUMI, G., TEZUKA, O. Y IKEDA, T., 1958

*The submicroscopic structure of the inner segments of the rods and cones in the retina of Uroloncha striata Var Domestica Flower, J.*

*Ultrastructure Research*, 1, 295-306.

- 129 -

L A M I N A S



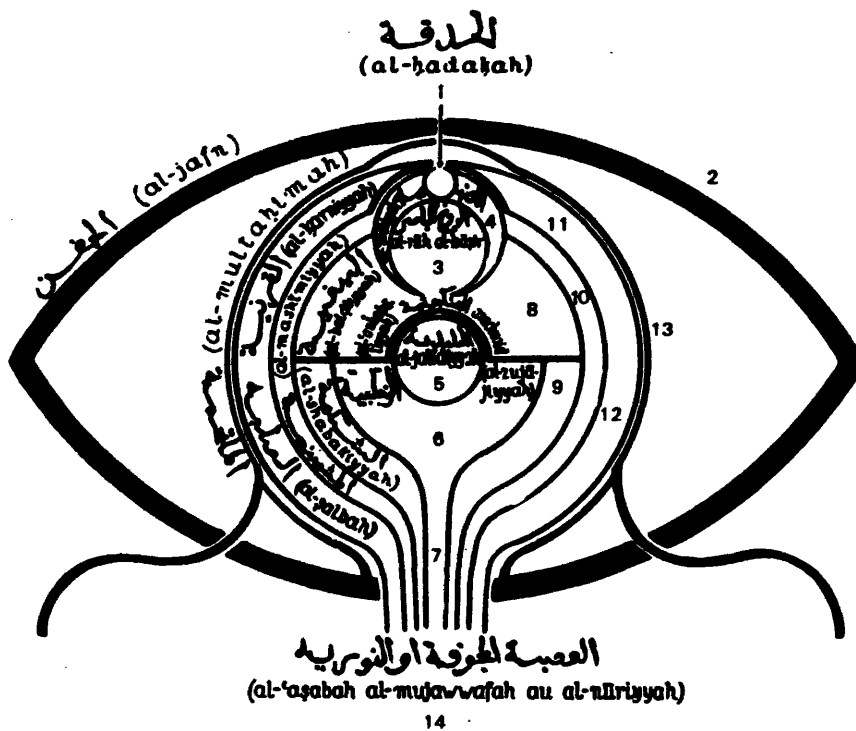


FIG. 1

Diagrama del ojo tomado de Hunain Ibn Ishak: "Diez tratados sobre la estructura del ojo, etc."

1, pupila; 2, parpado; 3, espíritu visual; 4, uvea; 5, cristalino  
6, vítreo; 7, canal; 8, acuoso; 9, retina; 10, coroides; 11, cornea; 12, esclerótica; 13, conjuntiva; 14, nervio óptico.



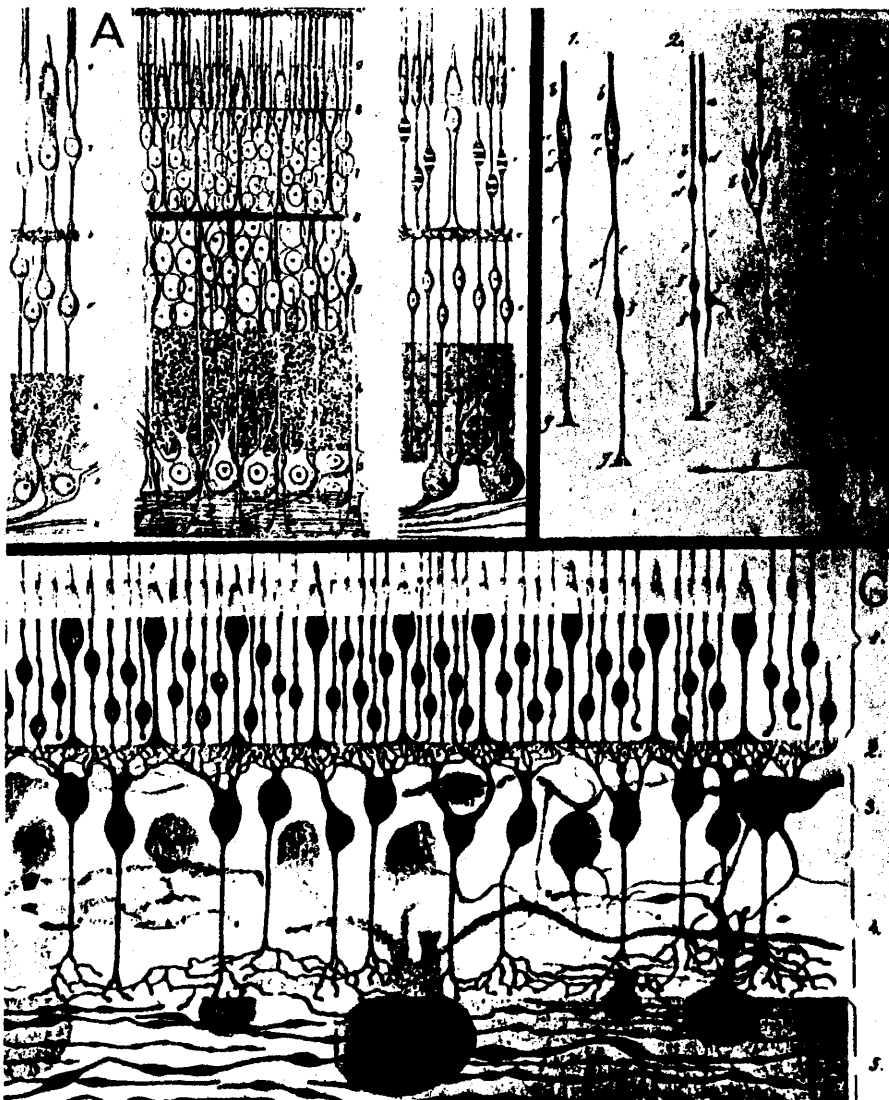


FIG. 2

- A. Esquemas de la retina de M. Schultze (1872) y Schwalbe (1874). 9, conos y bastones; 8, limitante externa; 6, plexiforme externa; 4, plexiforme interna.
- B. Figura tomada de Kölliker (1854) ilustrando el concepto de la retina mantenido por los primeros histólogos.
- C. Esquema de Tartuferi (1887). 1, conos y bastones; 2, plexiforme externa; 3, granos internos; 4, plexiforme interna; 5, fibras del nervio óptico.

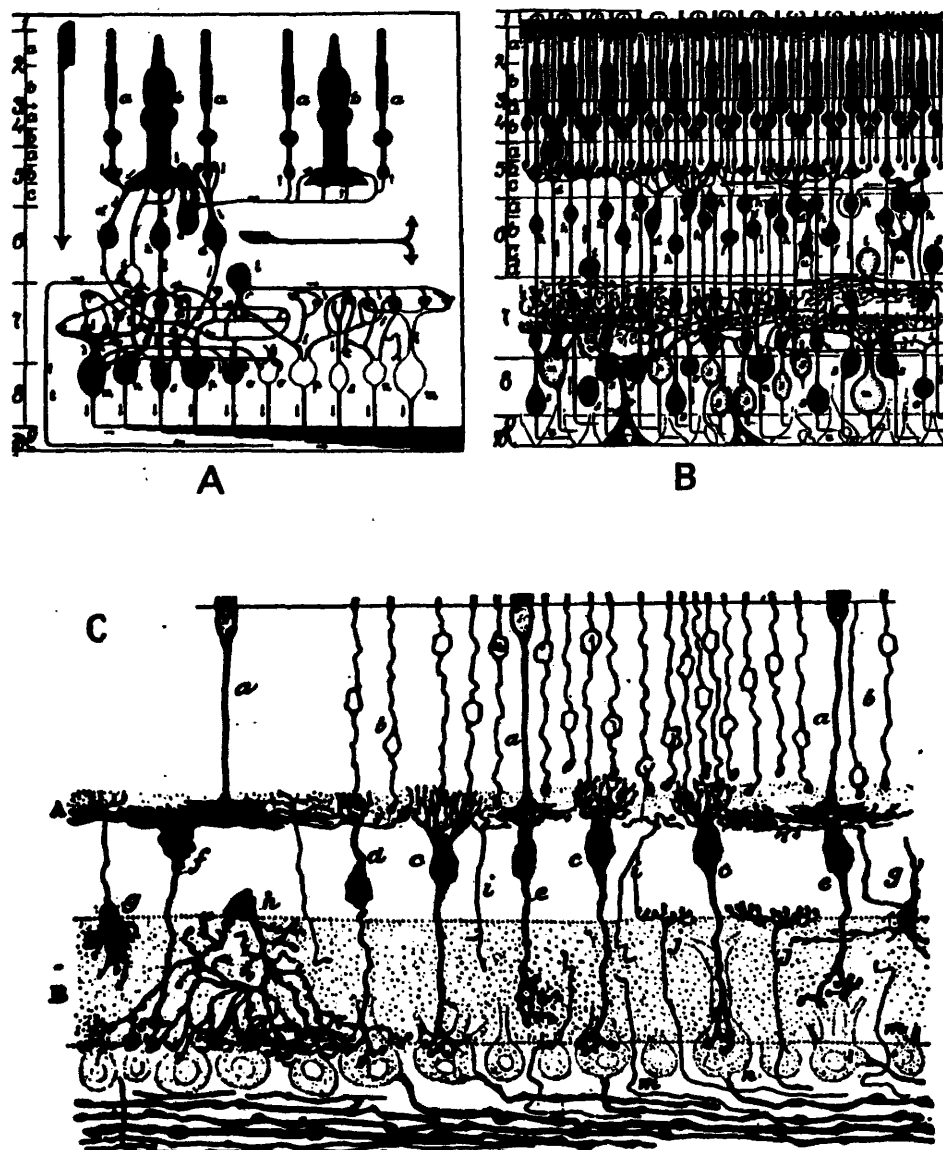


FIG. 3

A y B. Esquemas de organización retiniana de Polyak (1941).  
 C. Esquema de Cajal de las vías centrípetas visuales a nivel de la retina: a, conos; b, bastones; c y d, bipolares para bastones; e, bipolares de conos; h, célula amacrina; j, fibras centrifugas; m y n, células ganglionares.

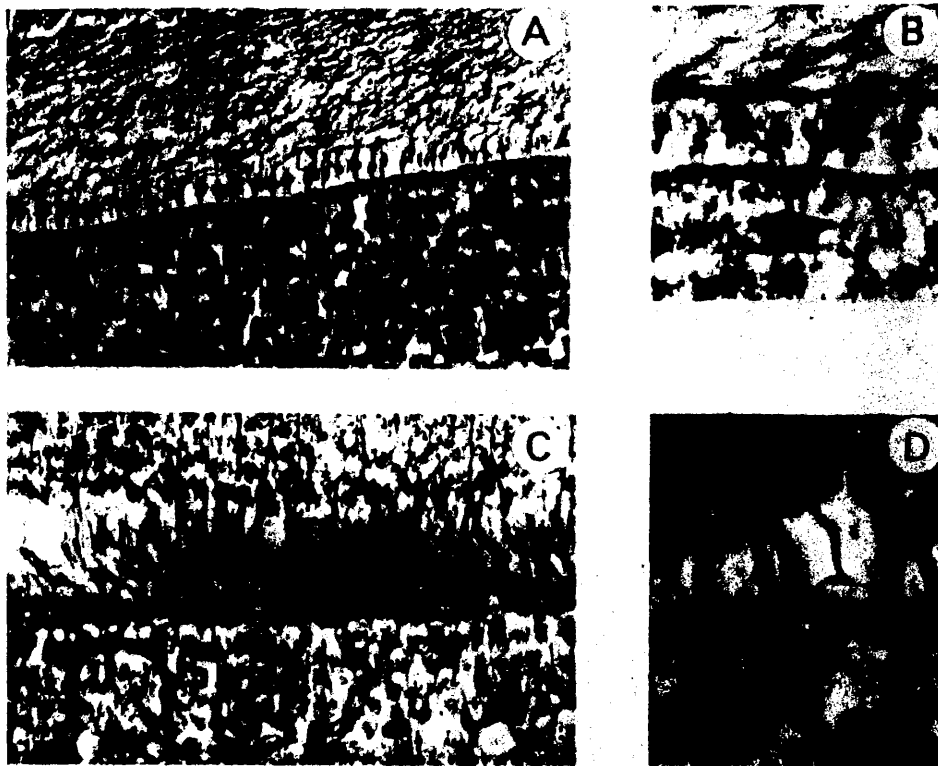


FIG. 4

- A. Corte perpendicular de la retina humana método de Balbuena, se ve con claridad la fila de los cuerpos sinápticos de los conos no teñidos ( ) y el penacho dendrítico de la bipolar individual del cono intensamente teñida.
- B. Detalle a mayor aumento de los pies de conos sin teñir, el penacho dendrítico de la bipolar individual y las esférulas de bastones ( ), a esta estructura es la que Fortin denominó "aparatos dioptricos".
- C. Retina humana teñida por el método de Balbuena en el que se encuentran teñidos los pies de los conos.
- D. Detalle a mayor amplificación de los pies de cono que presenta amplias vacuolizaciones en una retina humana teñida con el método de Balbuena.



FIG. 5

Celula horizontal sin axon de la retina del gato. Metodo de Golgi-Colonnier. Retina entera vista de plano. (→) Ramilletes de botones que penetran en las triadas de conos. (Gallego 1976)

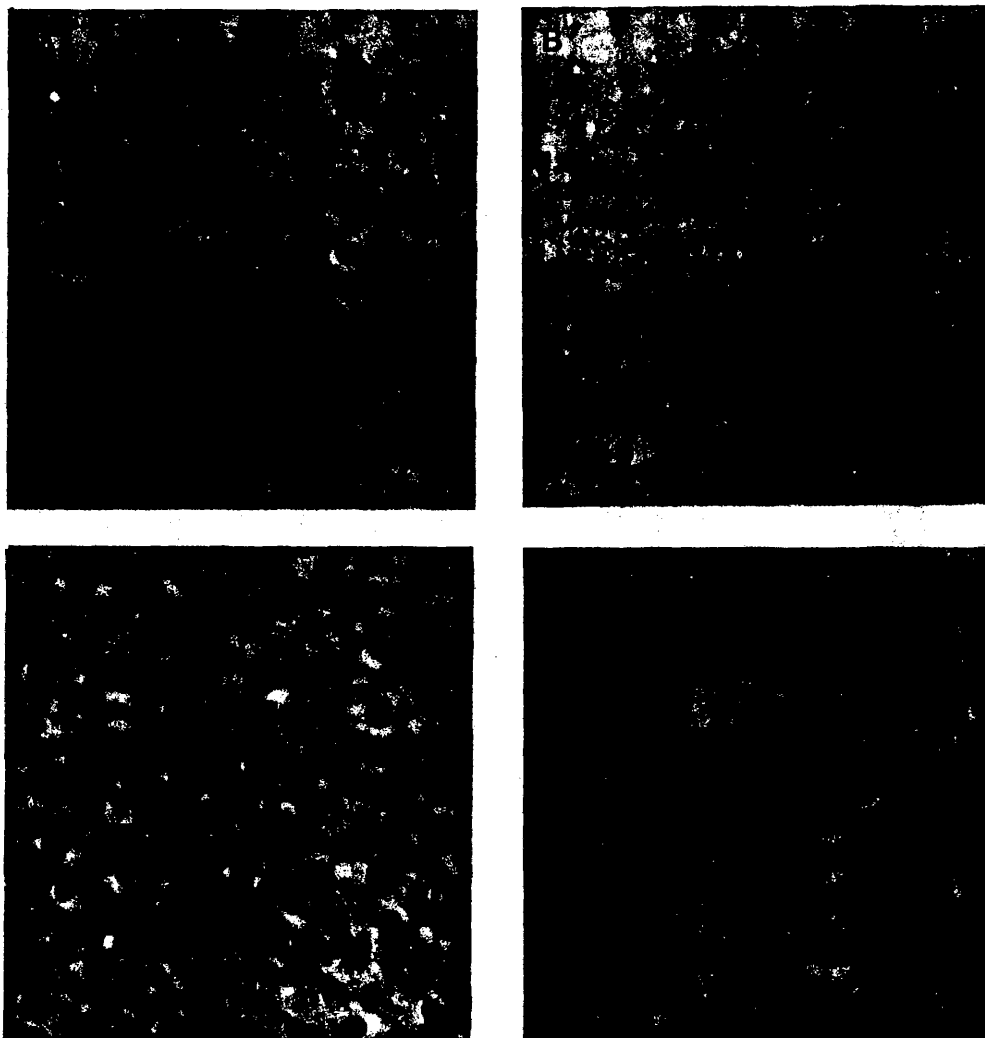


FIG. 6

Retina sin fijar. Fotografiada de plano.

A : embrión de pollo de 13 días.

B : embrión de pollo de 16 días.

C : pollo de 1 mes.

D : área roja de la retina de la paloma.

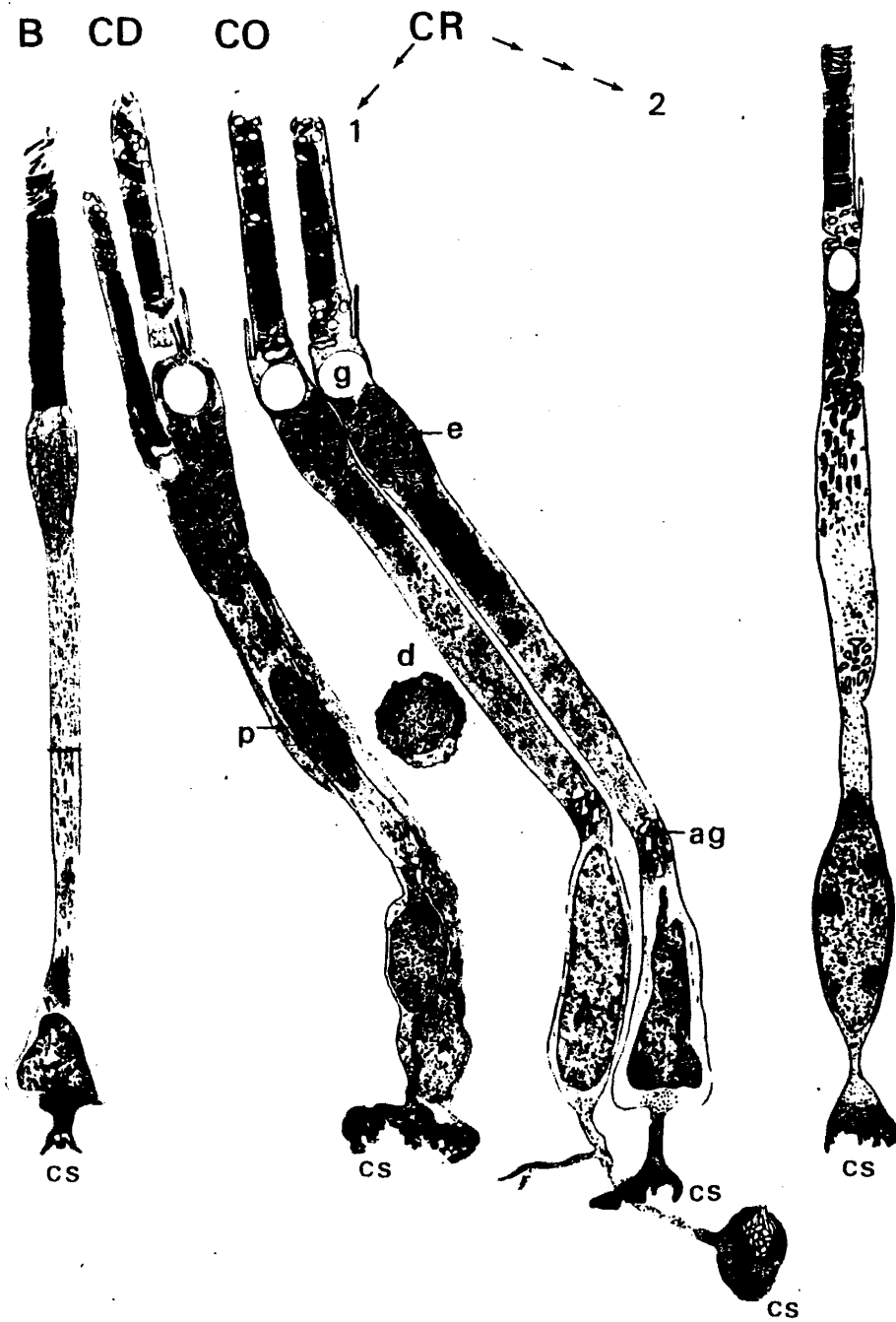


FIG. 7

B, bastón; CD, cono doble; CO, cono oblicuo; CR, cono recto 1 y 2; CS, cuerpo sináptico; g, gota lipídica, e, elipsoide; p, paraboloide; ag, aparato de Golgi; d, sección transversal de un cono doble a nivel del paraboloide.



FIG. 8

Fotorreceptores aislados. Retina de pollo.

B, bastón; CD, cono doble, CDP, miembro principal del cono doble; CDA, miembro accesorio del cono doble; CRR, cono recto rojo; CSA, cono simple amarillo; CO, cono oblicuo.

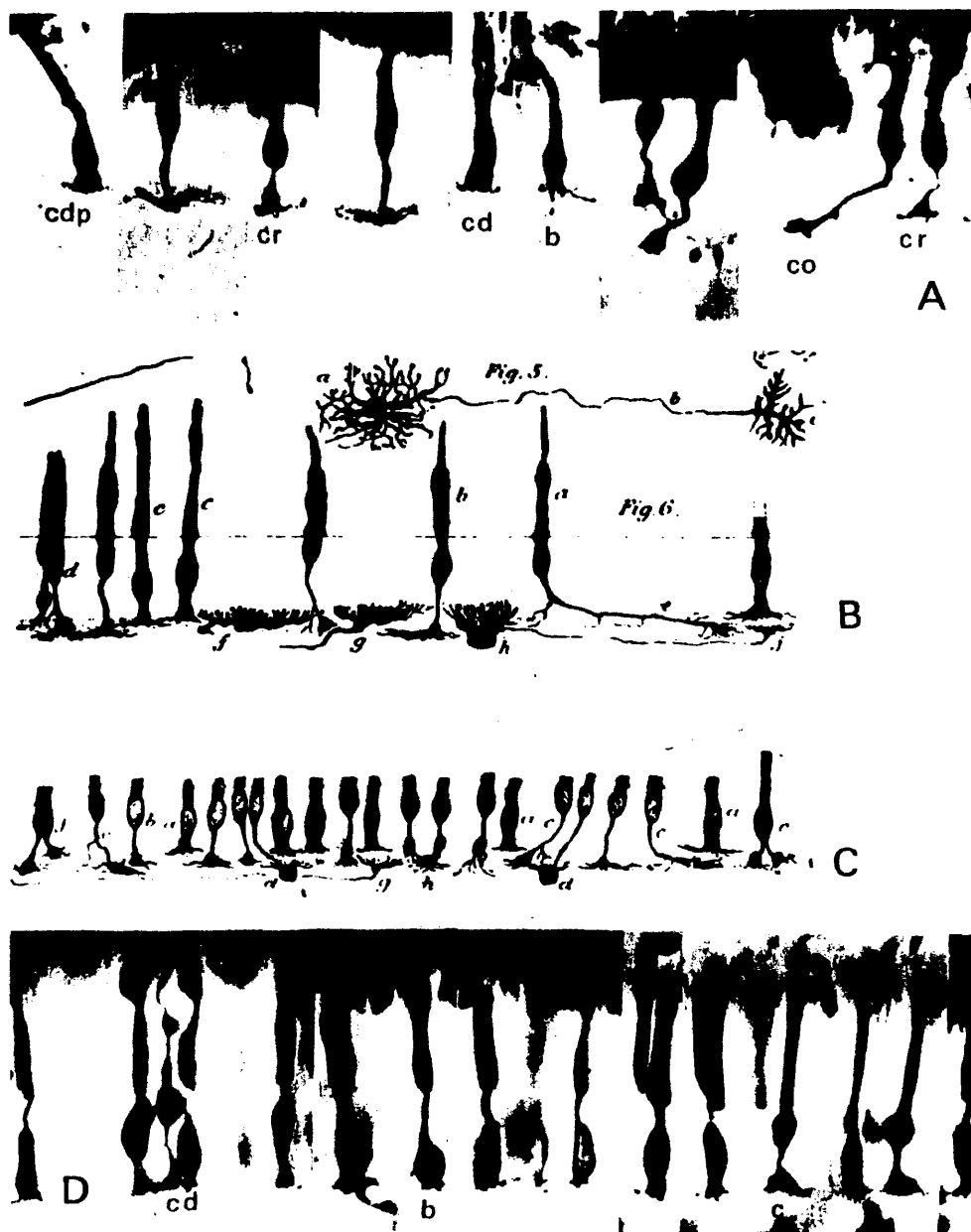


FIG. 9

- A. Fotorreceptores de la retina del pollo, método de Golgi: cd, cono doble; cdp, miembro principal del cono doble; cr, cono recto; b, bastón; co, cono oblicuo.
- B. Dibujo de Cajal (1893) lámina IV. a, cono oblicuo; e, ramas colaterales del mismo; d, cono recto; c, bastón; d, conos dobles.
- C. Dibujo de Cajal (1893) lámina IV. a, bastón; b, cono recto; c y d, conos oblicuos; e y f, conos gemelos.
- D. Retina de lechuga método de Golgi. cd, cono doble; b, bastón; c, cono simple.



X



FIG. 10

Retina de pollo. Corte perpendicular M.E. b, bastón; cr, cono recto; ch, célula horizontal; cd, cono doble; p, principal; a, accesorio; pe, plexiforme externa.



FIG. 11

Retina de mochuelo corte perpendicular M.E. b, bastón; c, cono; ta, terminal axónica; ch, célula horizontal.

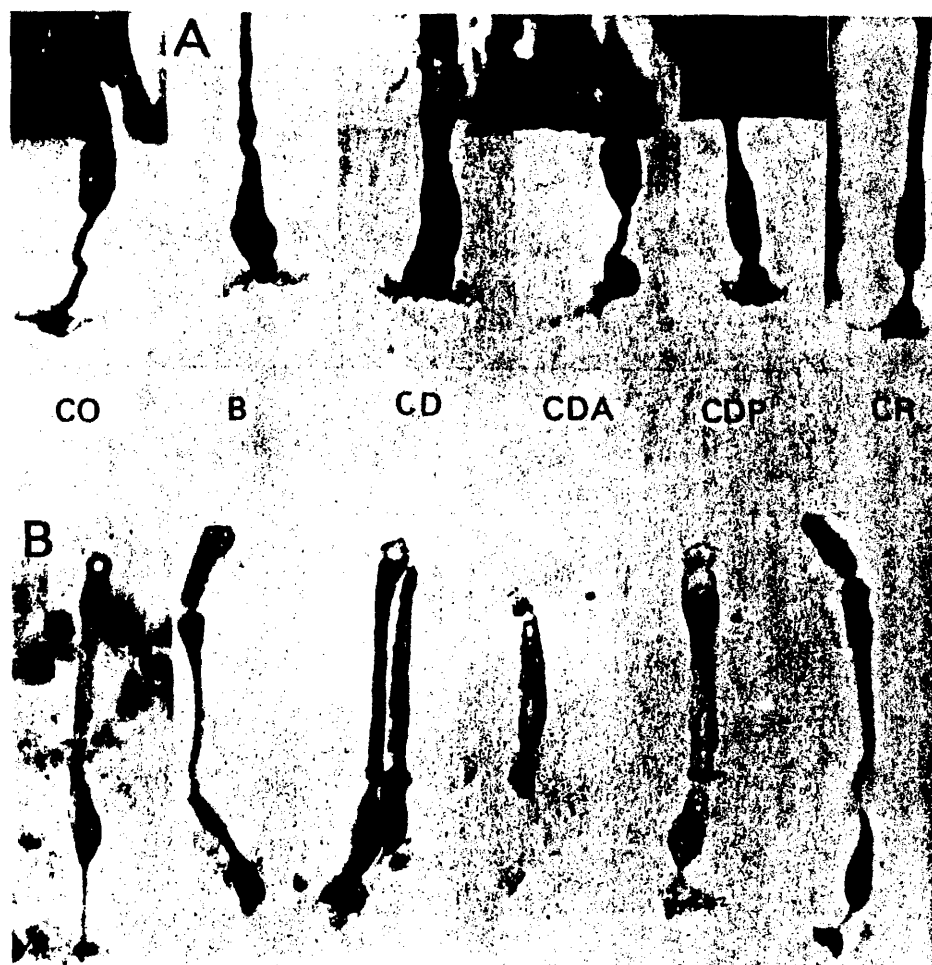


FIG. 12

Imágenes comparativas de fotorreceptores obtenidas con el método de Golgi (A) y con aislamiento enzimático (B).

CO, cono oblicuo; B, bastón; CD, cono doble; CDP, miembro principal del cono doble; CDA, miembro accesorio del cono doble; CR, cono recto.

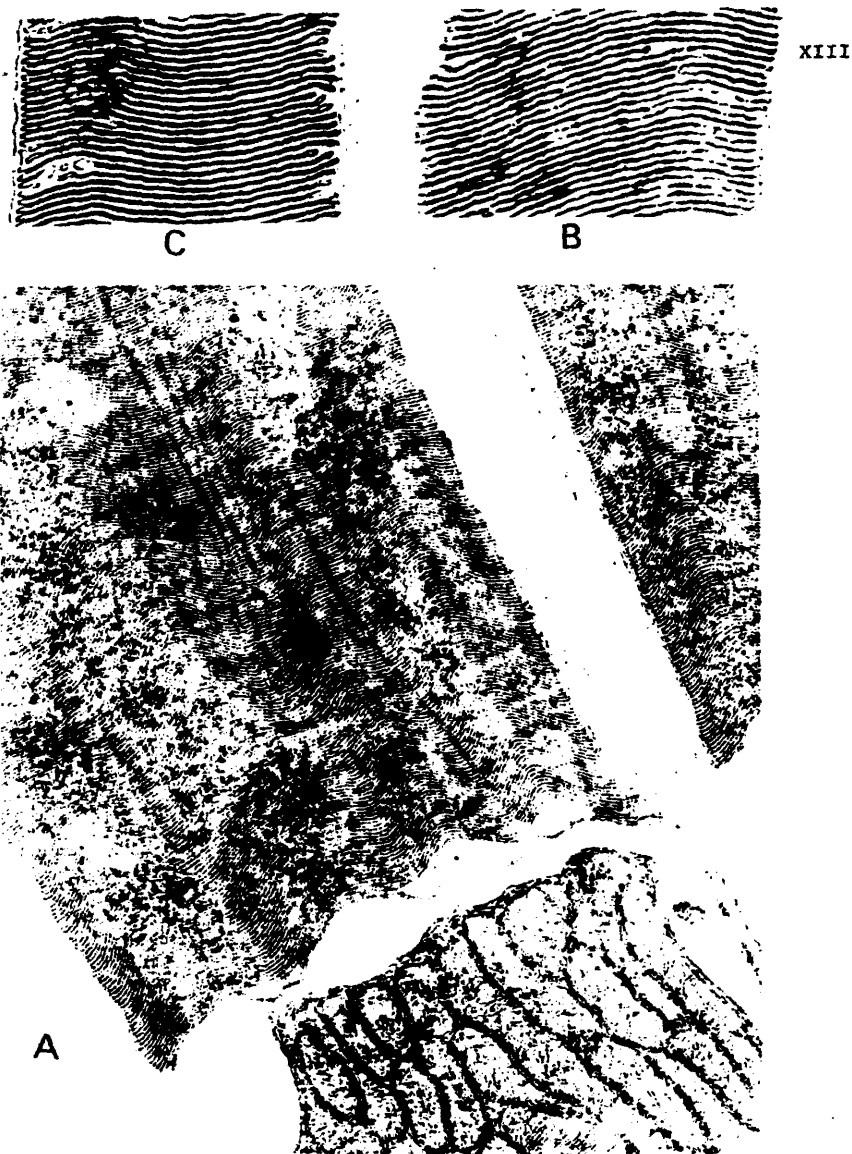


FIG. 13

Detalle del segmento externo de la retina del mochuelo M.E.

- A. Se ve parte de las mitocondrias del elipsoide del segmento interno, el comienzo del segmento externo, con sus sáculos bien evidentes.
- B. Detalle a mayor amplificación de los sáculos del segmento externo de un bastón.
- C. Idem. de un cono en el que se observa como en el lado izdo. los sáculos están abiertos al citoplasma.

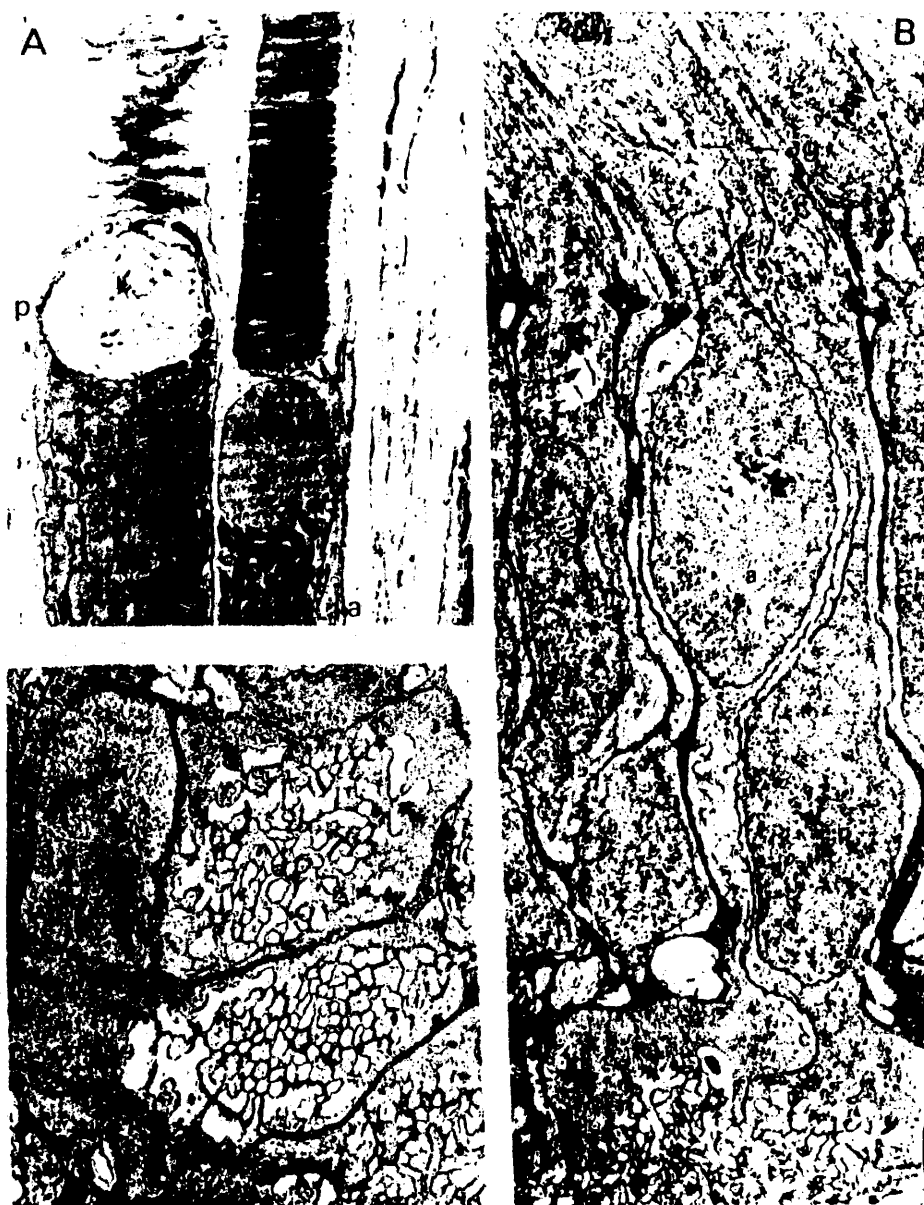


FIG. 14

Cono doble de la retina del pollo. A y B, secciones perpendiculares; C, sección tangencial M.E.

A. Elipsoides, gotas lipídicas y porción inferior del segmento externo de un cono doble, p, principal; a, accesorio; c, cilio de conexión.

B. Aparato de Golgi (ag) núcleos y cuerpos sinápticos (cs) de un cono doble; l, limitante externa.

C. Corte ligeramente oblicuo de los cuerpos sinápticos de un cono doble; p, principal; a, accesorio.

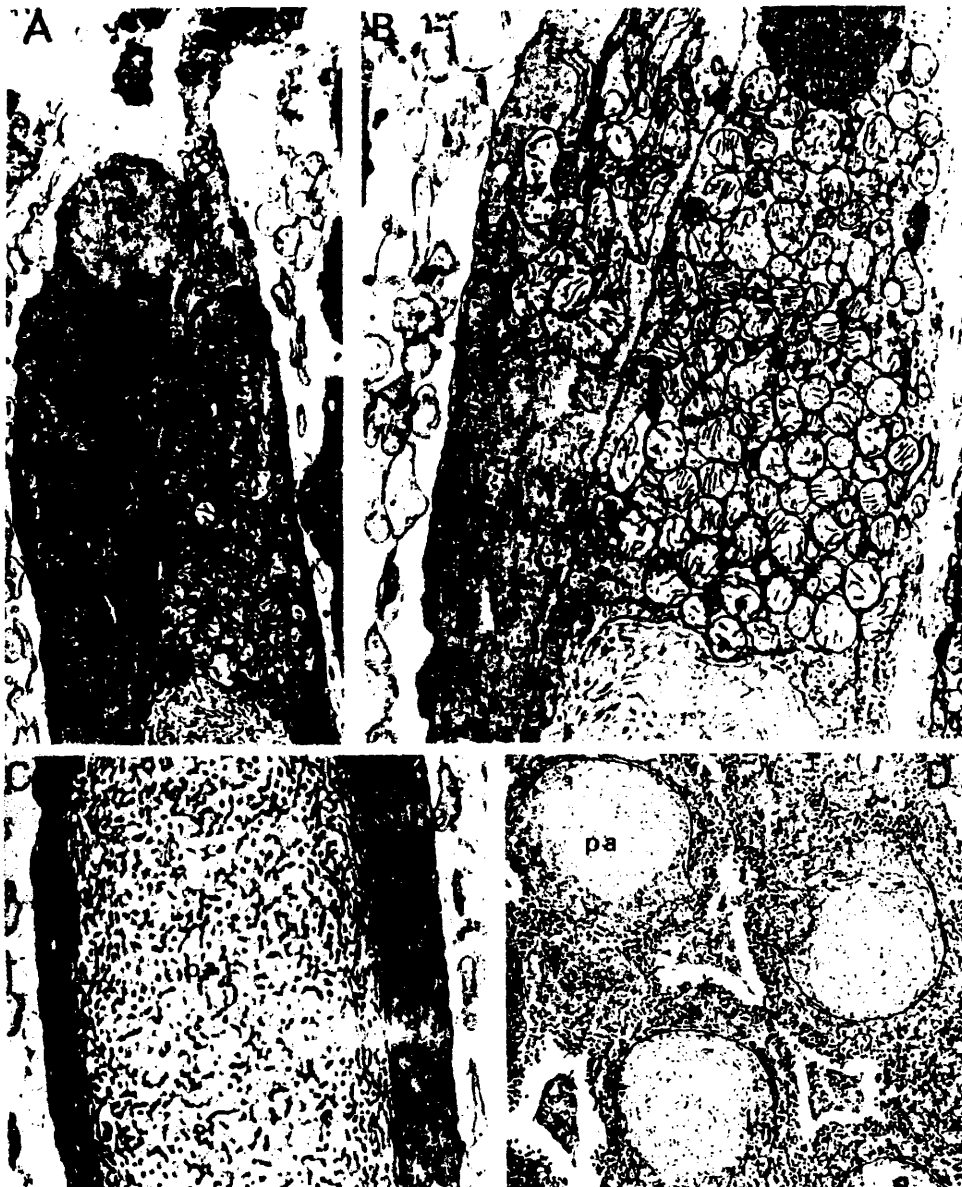


FIG. 15

Cono doble de la retina del pollo.

- A. Gotas lipídicas y elipsoides del cono principal (p) y accesorio (a).
- B. Detalle a mayor aumento de las mitocondrias del cono principal (p) y accesorio (a).
- C. Paraboloide del cono accesorio (pa).
- D. Sección transversal de tres conos dobles a nivel del paraboloide (pa); principal (p).



FIG. 16

Cono doble de la retina del mochuelo.

- A. Cono principal (p); cono accesorio (a); obsérvese la ausencia de gota lipídica en el cono accesorio.
- B. Detalle de la gota lipídica y elipsoide del cono principal (p) y accesorio (a).
- C. Detalle de la gota lipídica y cilio de conexión (c) del cono principal (p).
- D. Zona de conexión del segmento externo con el interno del cono accesorio (a).
- E y F. Cortes transversales a nivel del elipsoide del cono accesorio (a) y principal (p).
- G. l, limitante externa; m, fibra de Müller, d, desmosoma; ap, aparato de Golgi.

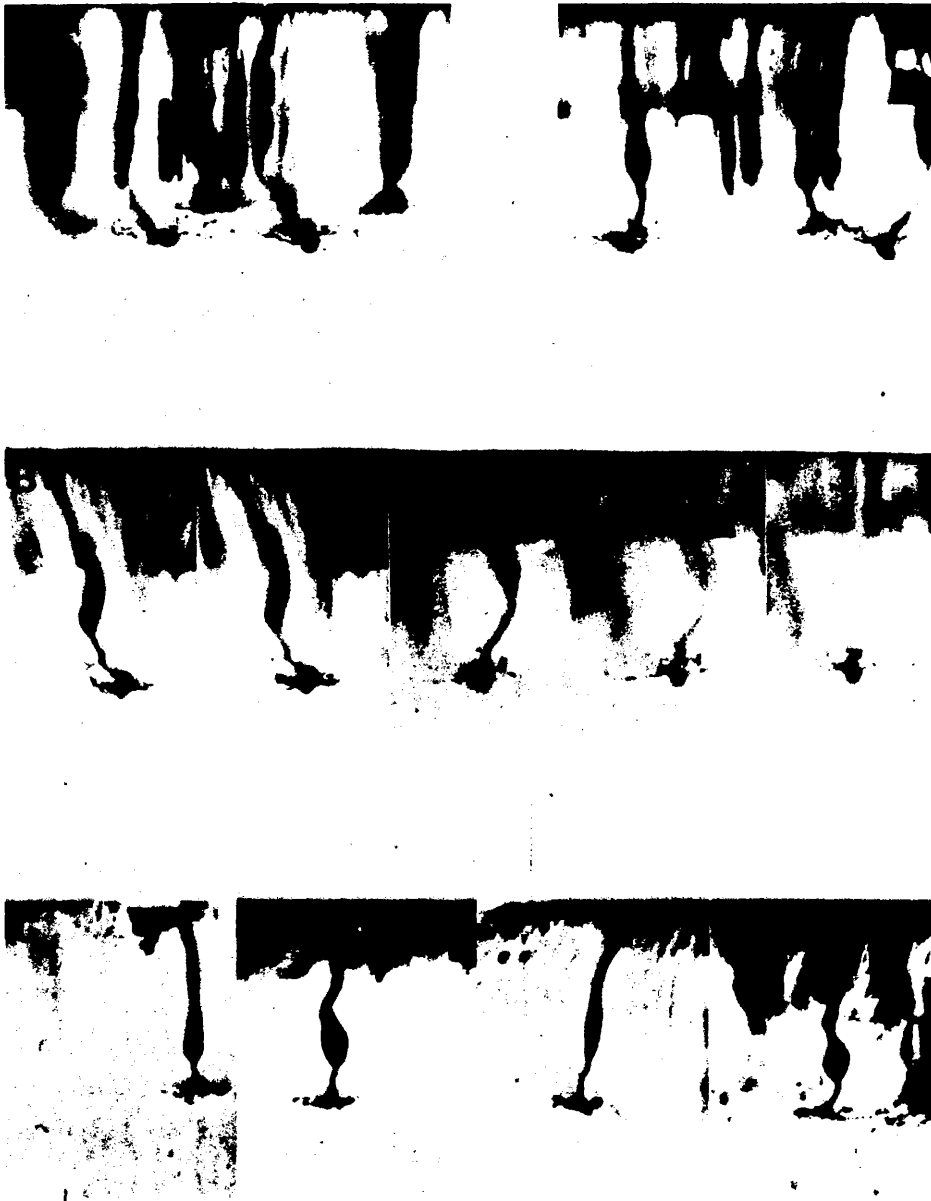


FIG. 17

Cono simple de la retina de las aves.

A y B. Conos oblicuos de la retina del cernícalo. En B, dos  
conos oblicuos fotografiados en varios planos.

C. Conos rectos de la retina del pollo.





FIG. 18

Corte perpendicular de la retina del pollo M.E.

cd, cono doble; a, accesorio; p, principal; I, cono recto tipo I; II, cono recto tipo II (cono rojo); e, elipsoide; r, retículo endoplásmico; pa, paraboloide.



FIG. 19

Retina de pollo corte longitudinal M.E. Se aprecia en toda su longitud un cono recto tipo II (cono rojo) y otro de tipo I cuyo cuerpo sináptico está fuera de la sección; L, limitante; CS, cuerpo sináptico.



FIG. 20

Corte transversal de la retina de cernícalo, a nivel del segmento interno de los fotorreceptores por encima de la limitante externa. CD, cono doble; B, bastón; V, "vellosidades"; d, contacto desmosómico; m, fibras de Müller.

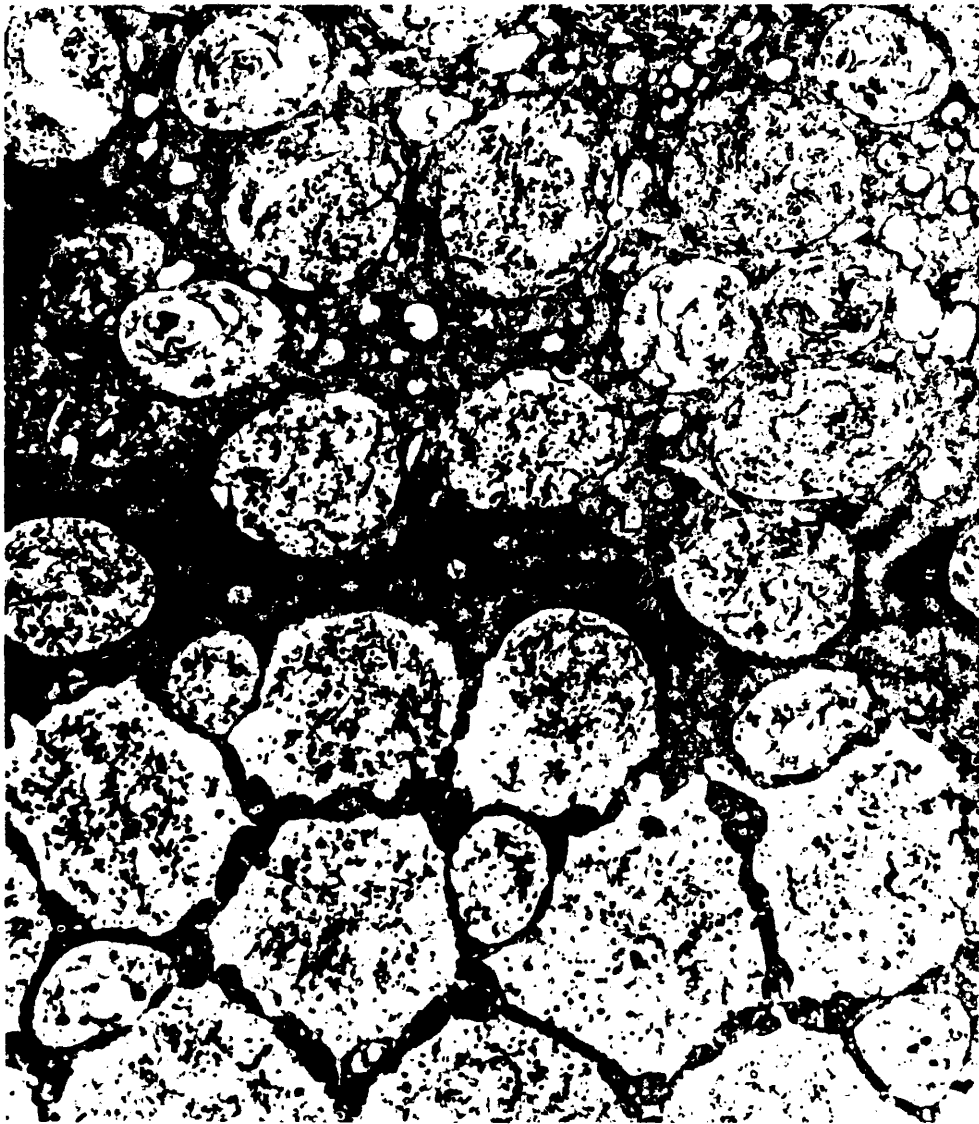


FIG. 21

Corte ligeramente oblicuo de los fotorreceptores de la retina del pollo a nivel de la limitante externa (L).



FIG. 22

Contactos entre fotorreceptores en la retina del mochuelo (A) y del pollo (B) M.E.

- A. Contactos tipo desmosómicos (d) entre los cuerpos sinápticos de un cono (C) y un bastón (B).
- B. Contactos tipo desmosómico (B) entre el cuerpo sináptico de un cono (C) y el filamento basilar de otro cono (C) adyacente.



FIG. 23

Corte perpendicular de la retina del mochuelo a nivel de los cuerpos sinápticos de los fotorreceptores. C, cono; B, bastón; f, filamento basilar invaginante; TA, terminal axónica.

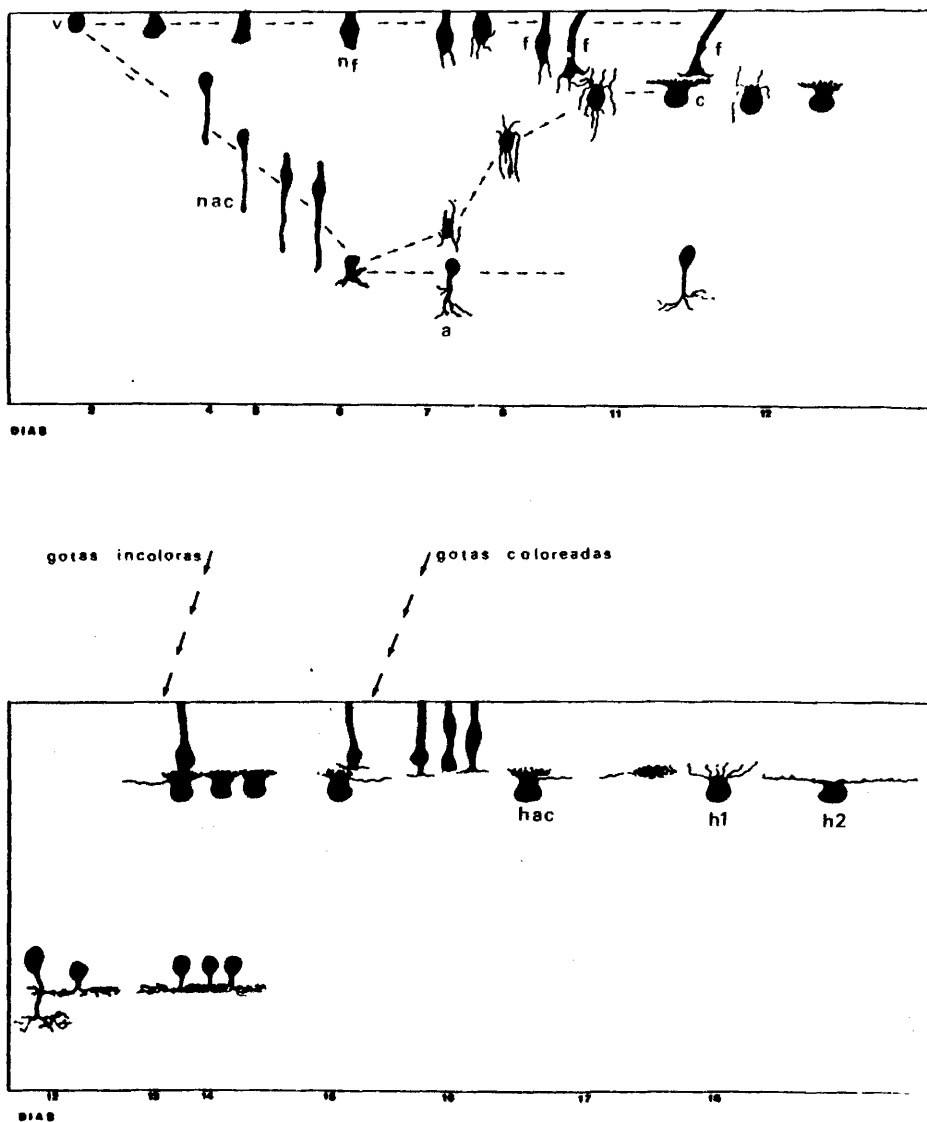


FIG. 24

Esquema del desarrollo embrionario de los fotorreceptores y células horizontales. v, célula ventricular; nf, neuroblasto de fotorreceptor; nac, neuroblasto común para amacrinas y células horizontales; a, amacrina; c, célula horizontal primitiva; hac, horizontal de axón corto; h1, horizontal sin axón tipo I; h2, horizontal sin axón tipo II.

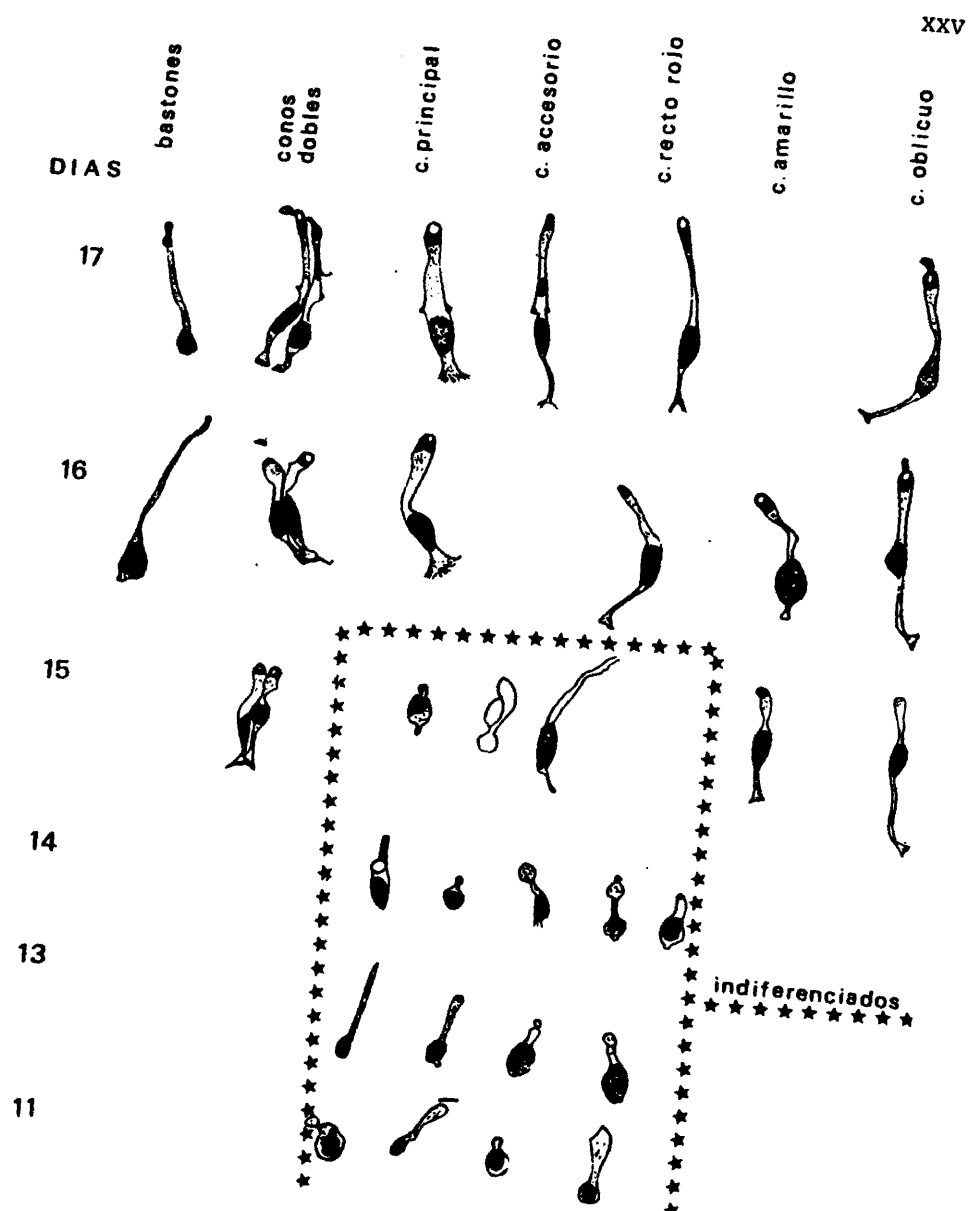


FIG. 25

Dibujos hechos sobre microfotografía de fotorreceptores aislados entre los días 11 y 17 de incubación (explicación en el texto).



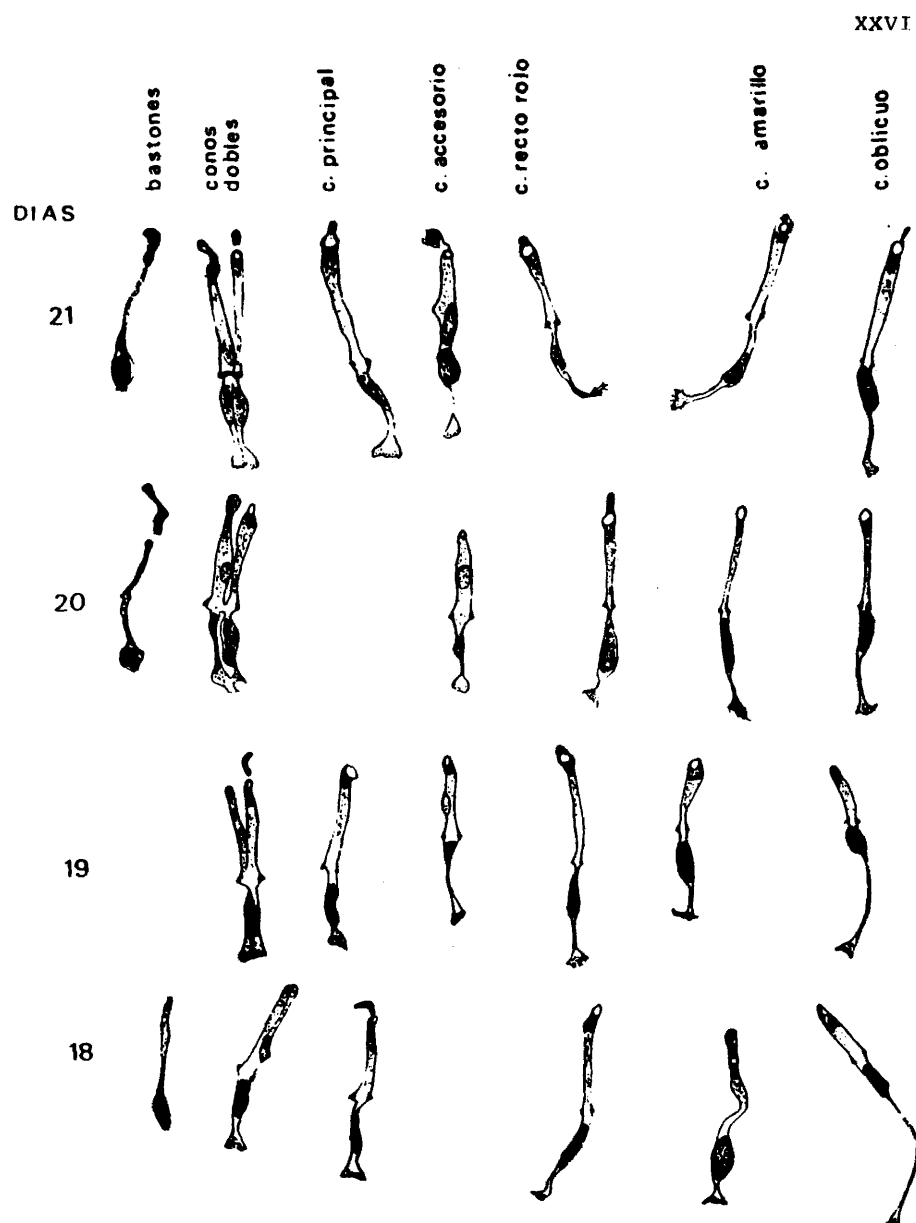


FIG. 26

Dibujos hechos sobre microfotografía de fotorreceptores aislados entre los días 18 y 21 de incubación (explicación en el texto).

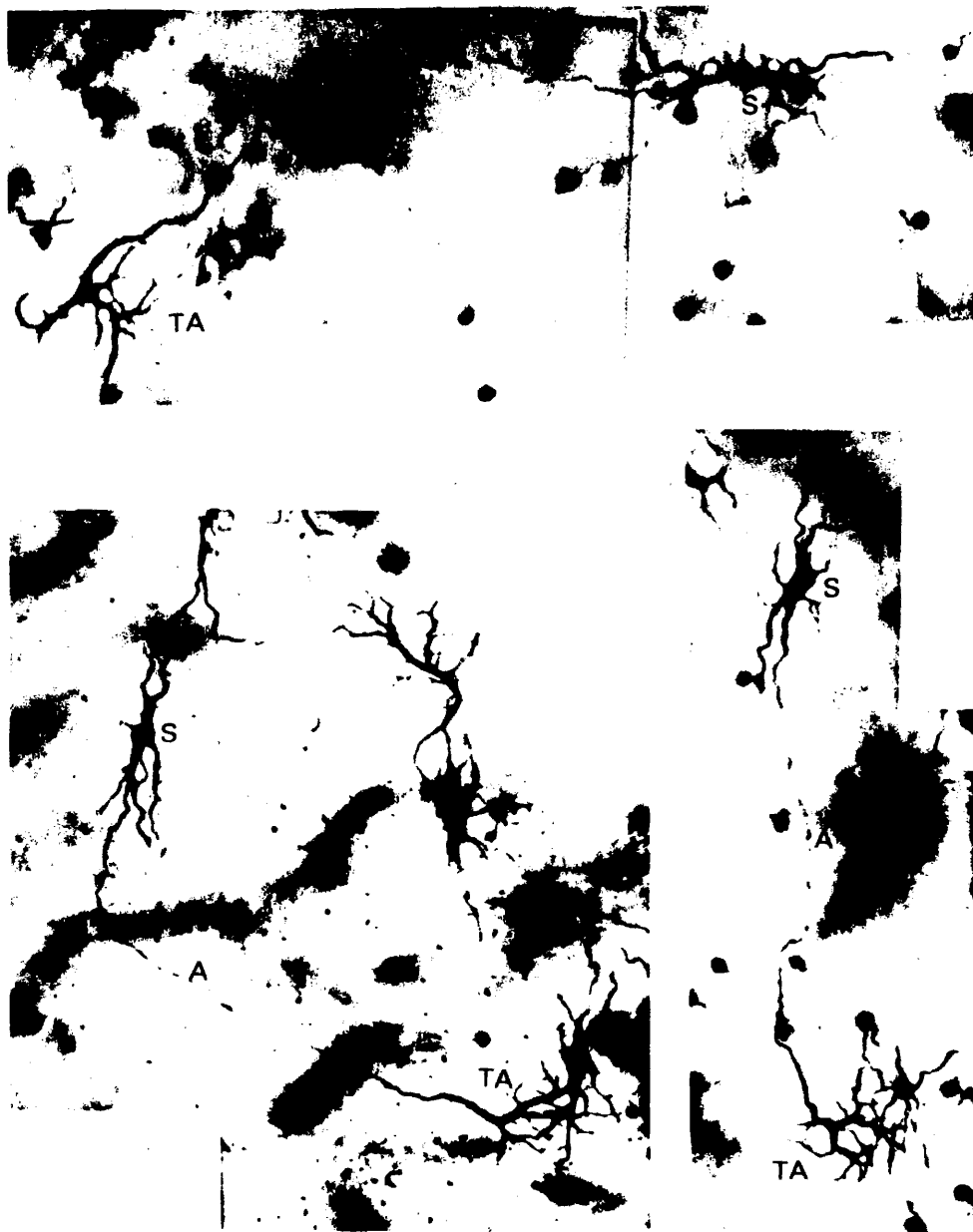


FIG. 27

Células horizontales de axón corto de la retina del cernícalo. Método Golgi-Colonnier. S, soma; A, axón; TA, terminal axónica.

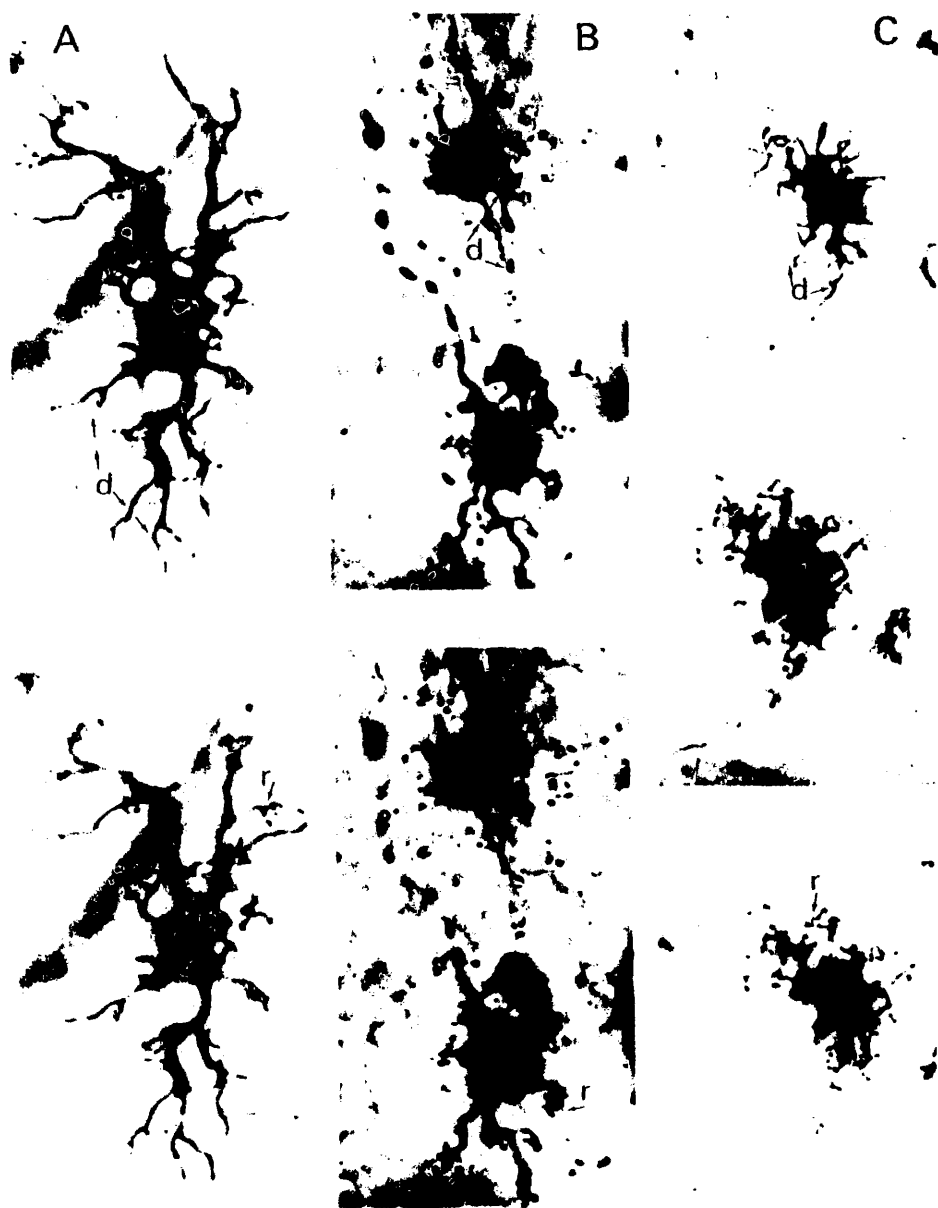


FIG. 28

Detalle de los somas de la célula horizontal de axón corto. Método Golgi-Colonnier. A, retina de cernícalo; B, retina de lechuza; C, retina de pollo. Los distintos planos de enfoque muestran las dendritas (d) y los ramilletes terminales (r).

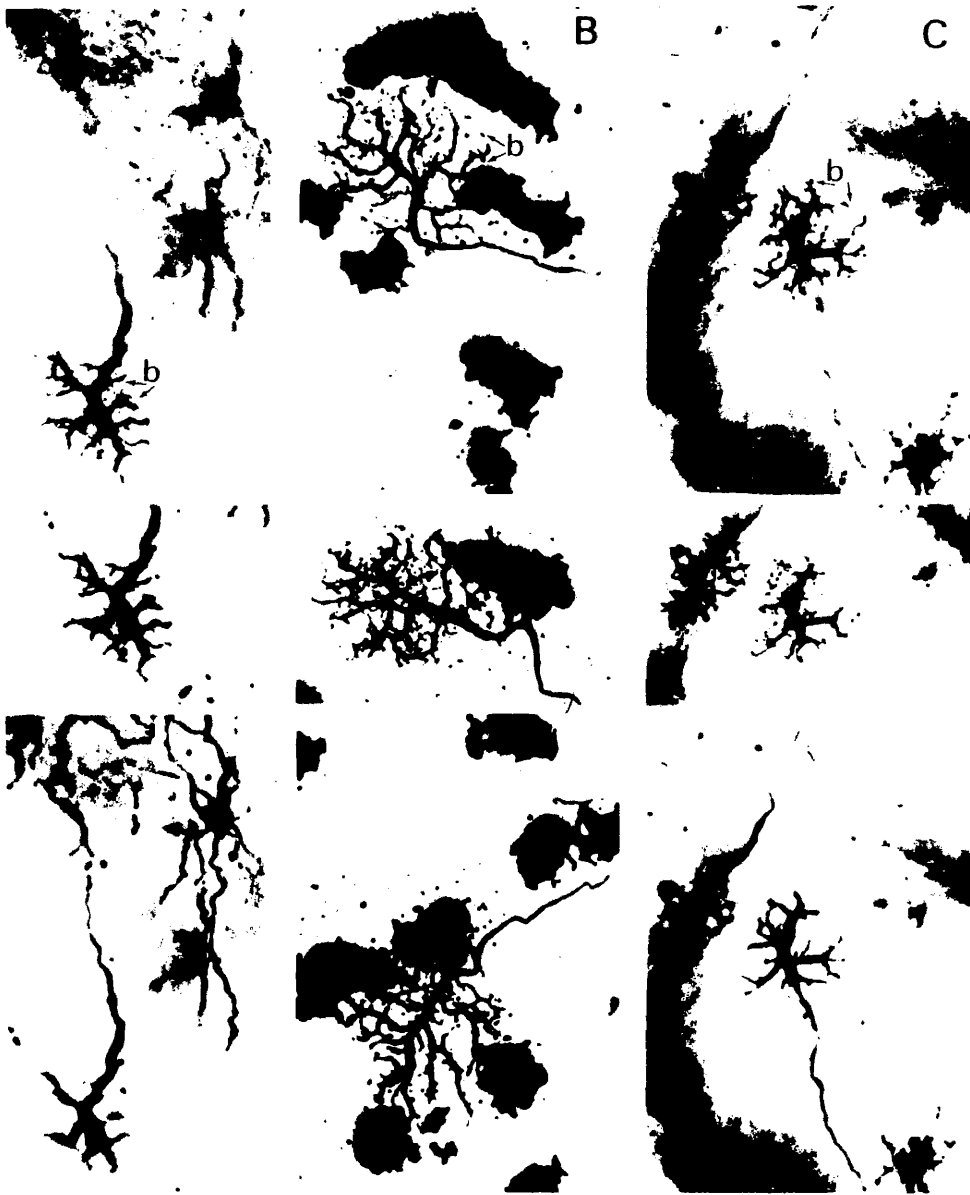


FIG. 29

Terminales axónicas de la célula horizontal de axón corto.  
A, retina de cernícalo; B, retina de lechuza; C, retina  
de pollo. Método de Golgi-Colonnier. A y C, tres planos  
de enfoque de una misma terminal axónica. (b) botones ter-  
minales.

XXX



FIG. 30

Corte oblicuo al nivel inferior de la capa plexiforme externa de la retina del pollo M.E. Célula horizontal (HC); terminal axónica (TA).



FIG. 31

Corte oblicuo de la retina del pollo a nivel de la capa plexiforme externa M.E. Terminales axónicas (TA) mostrando contactos de membrana entre ellas (→).

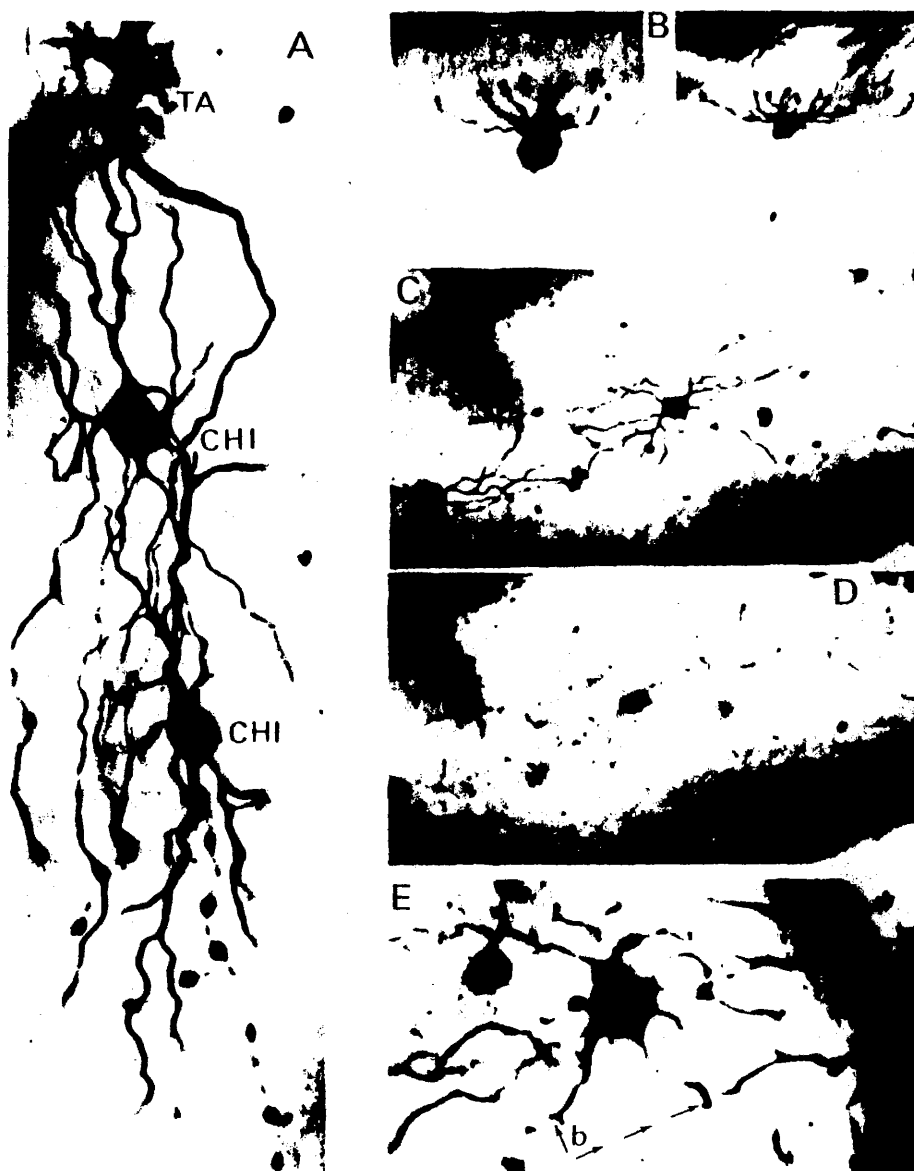


FIG. 32

Célula horizontal sin axón de tipo I de la retina del cer-nícalo. Método Golgi-Colonnier.

- A. Dos células sin axón tipo I mostrando sus procesos celulares entrelazados y una terminal axónica (TA) de una célula de axón corto.
- B. CHI, células horizontales sin axón de tipo I de la retina del pollo, vistas en una sección perpendicular.
- C y D. Dos planos de enfoque de una célula horizontal sin axón tipo I.
- E. Detalle de los botones terminales (b) de una célula horizontal sin axón tipo I.

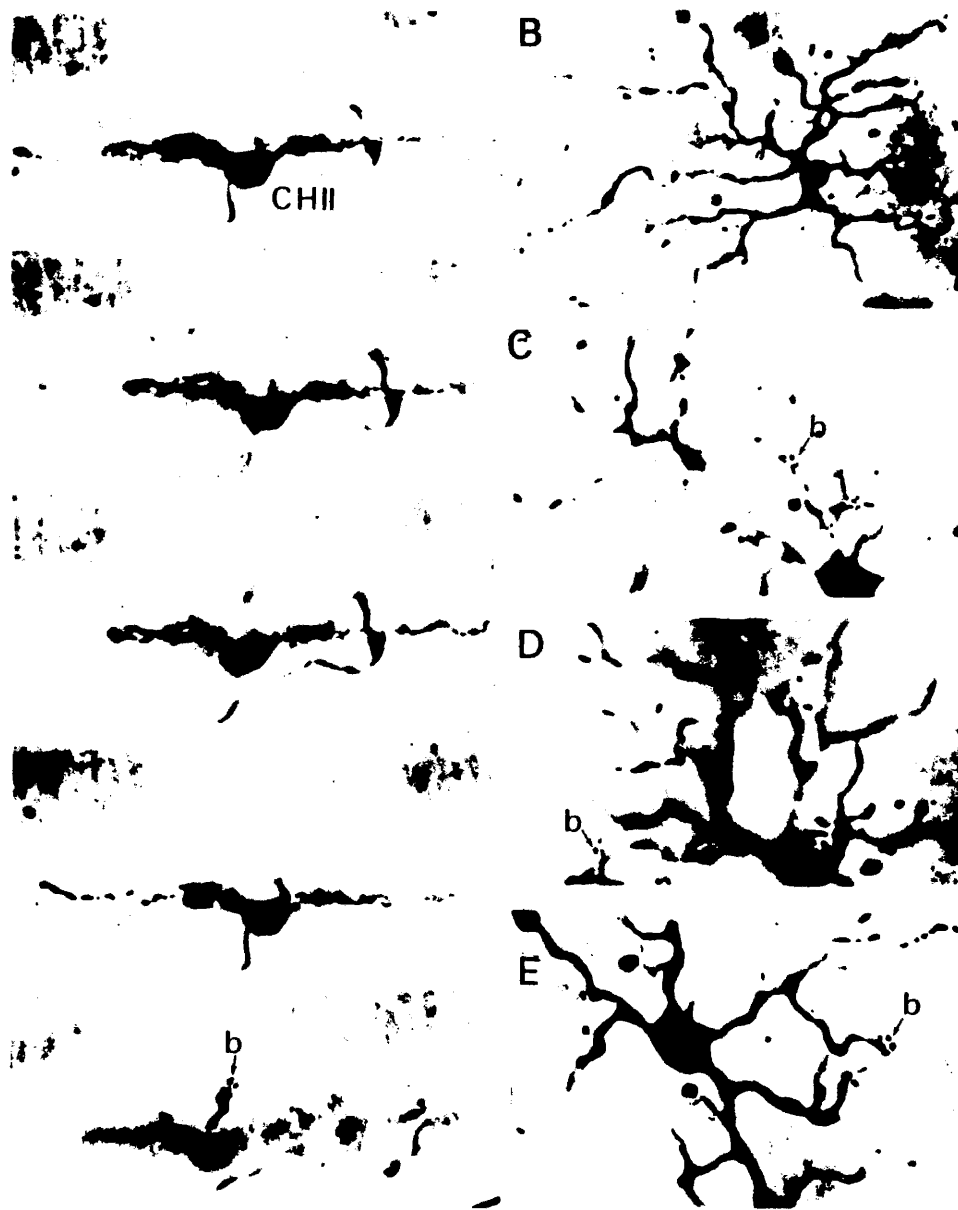


FIG. 33

Célula horizontal sin axón tipo II. Método de Golgi-Colonnier. Retina de pollo.

- A. Distintos planos de enfoque de una célula horizontal sin axón tipo II (CHII), en corte perpendicular de la retina. En la foto más inferior se observa claramente un proceso celular con dos botones terminales (b).
- B. Célula horizontal sin axón tipo II vista en sección transversal.
- C, D y E. Detalle de las ramas terminales y botones (b).



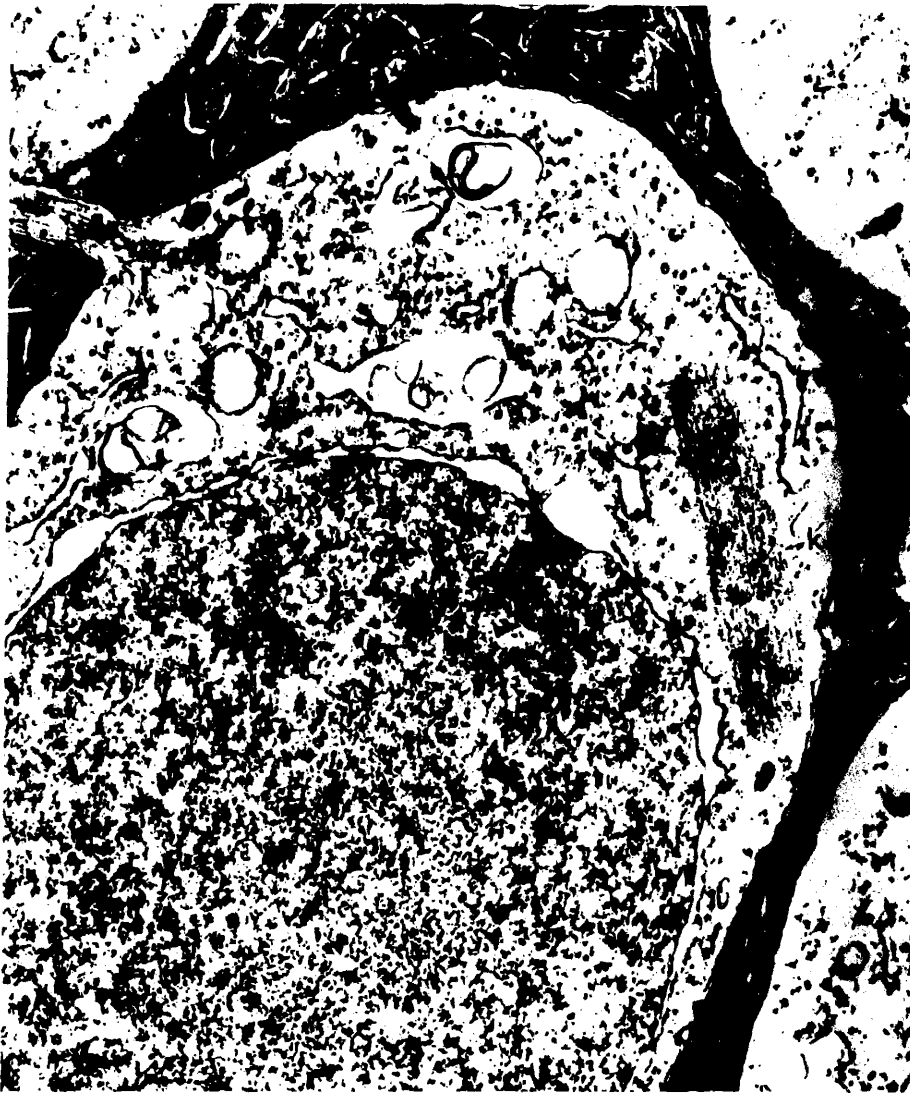


FIG. 34

Célula horizontal de la retina del pollo M.E. K, estructura que recuerda al cristalóide de Kolmer; nt, neurotúbulos.

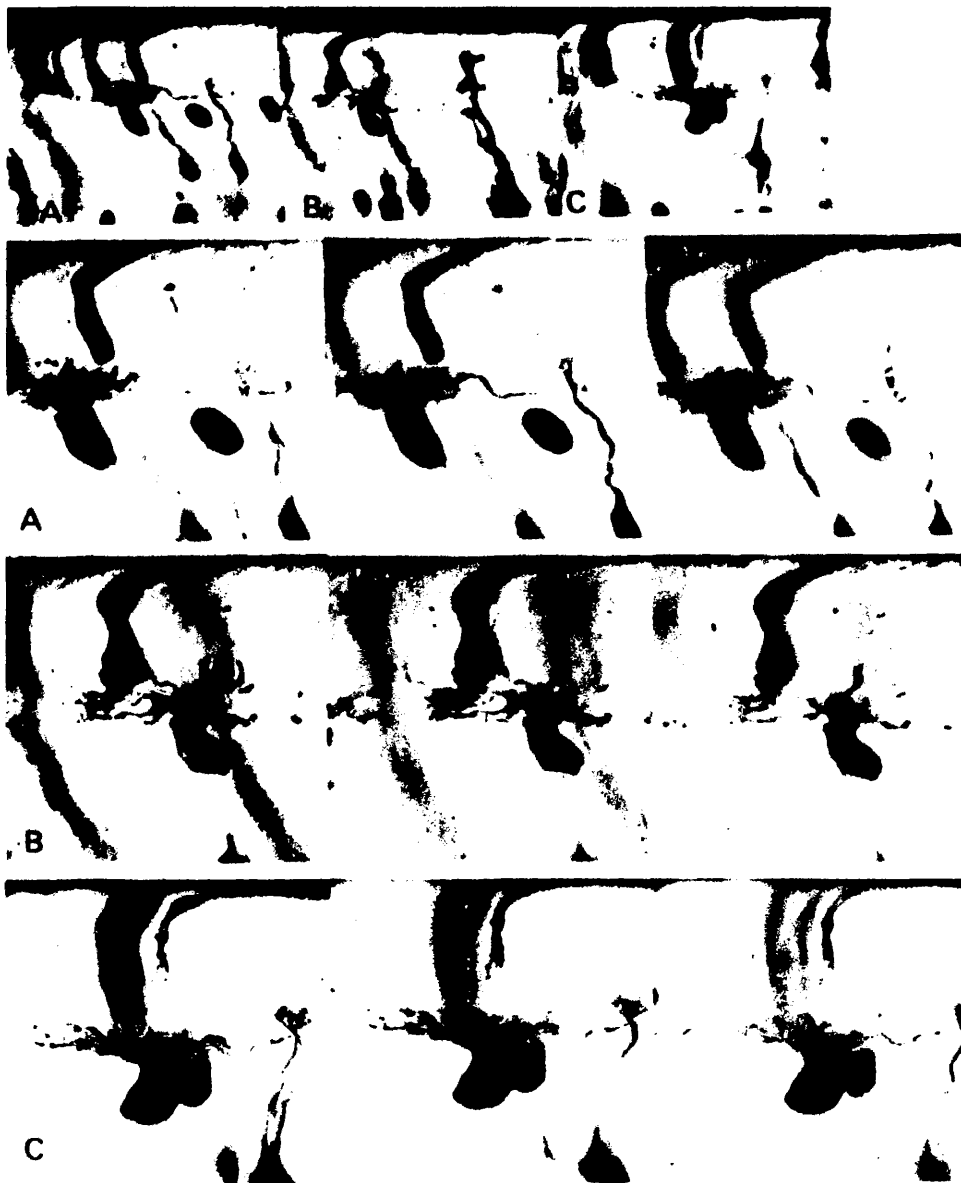


FIG. 35

Retina de embrión de pollo (18 días). Cortes perpendiculares. Método Golgi-Stensaas.

- A. Célula horizontal de axón corto.
- B. Célula horizontal sin axón tipo I.
- C. Célula horizontal sin axón tipo II.

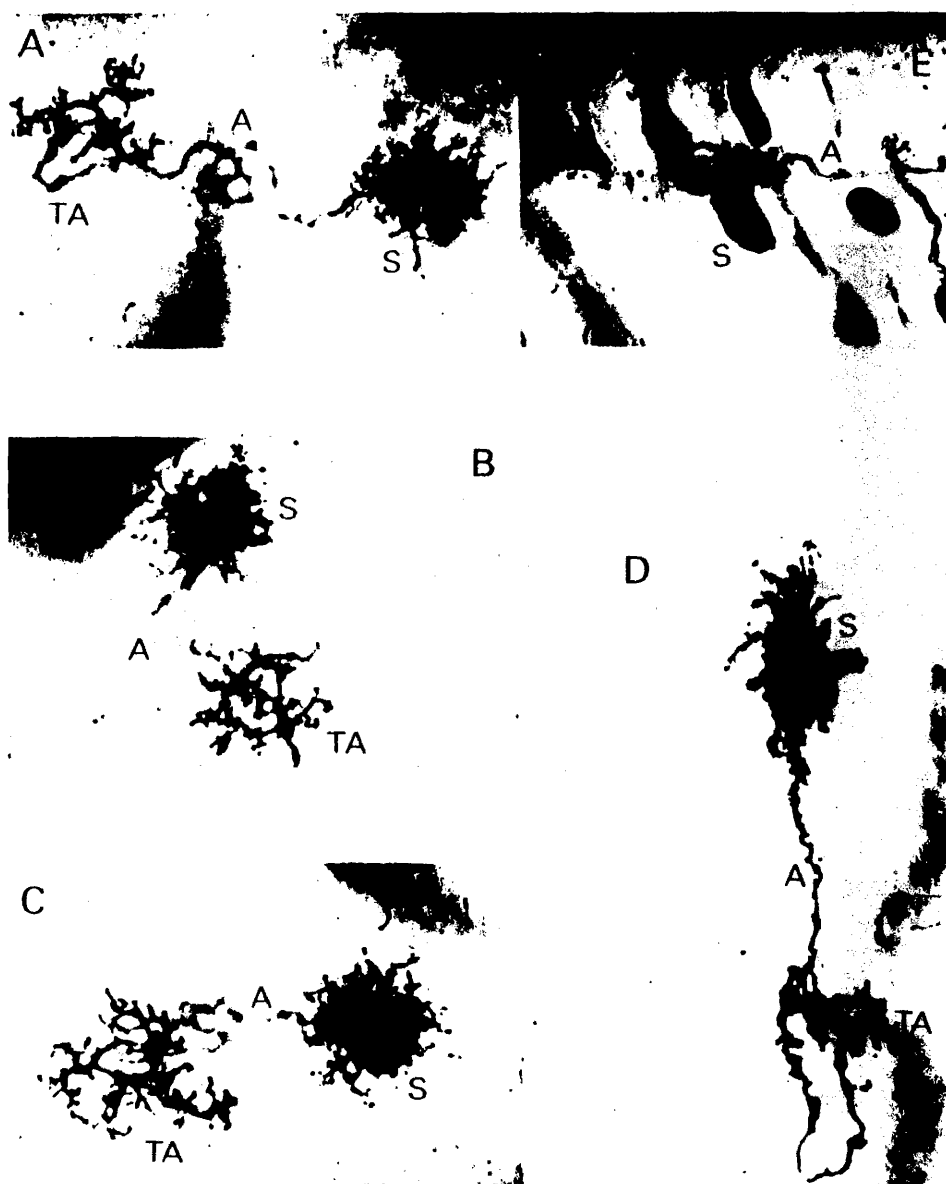


FIG. 36

Células horizontales de axón corto de la retina de embrión de pollo de 18 días. A, B, C y D, cuatro células teñidas en la retina entera y vistas de plano. Método de Golgi-Colonnier. S, soma; A, axón; TA, terminal axónica; E, célula horizontal de axón corto vista en corte perpendicular; S, soma; A, axón.

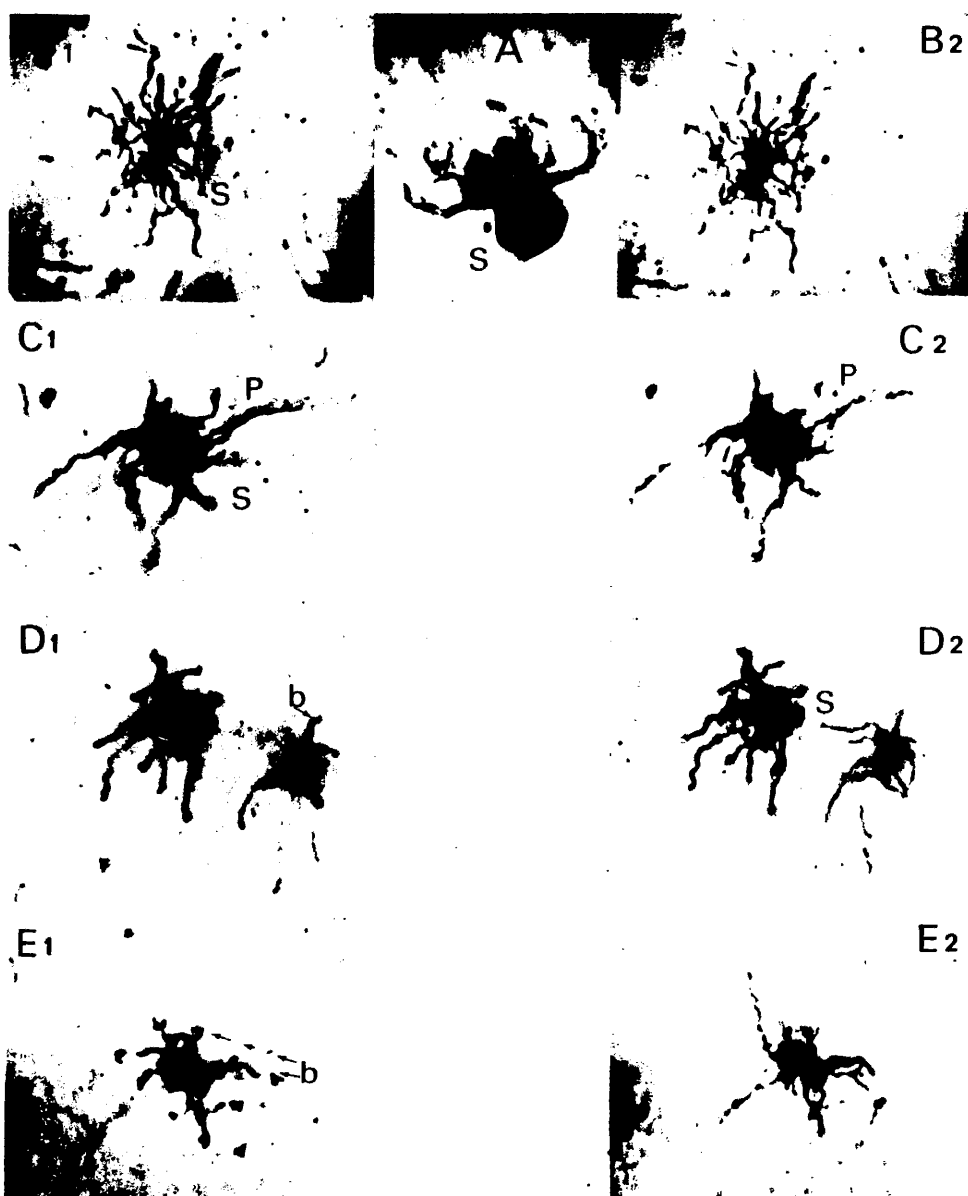


FIG. 37

Célula horizontal sin axón de tipo I de la retina de embrión de pollo de 18 días. A, corte perpendicular; D, C, D y E, vistas de plano en la retina impregnada in toto: cuatro células tipo I en dos planos de enfoque. S, soma; P, procesos celulares; b, botones terminales.

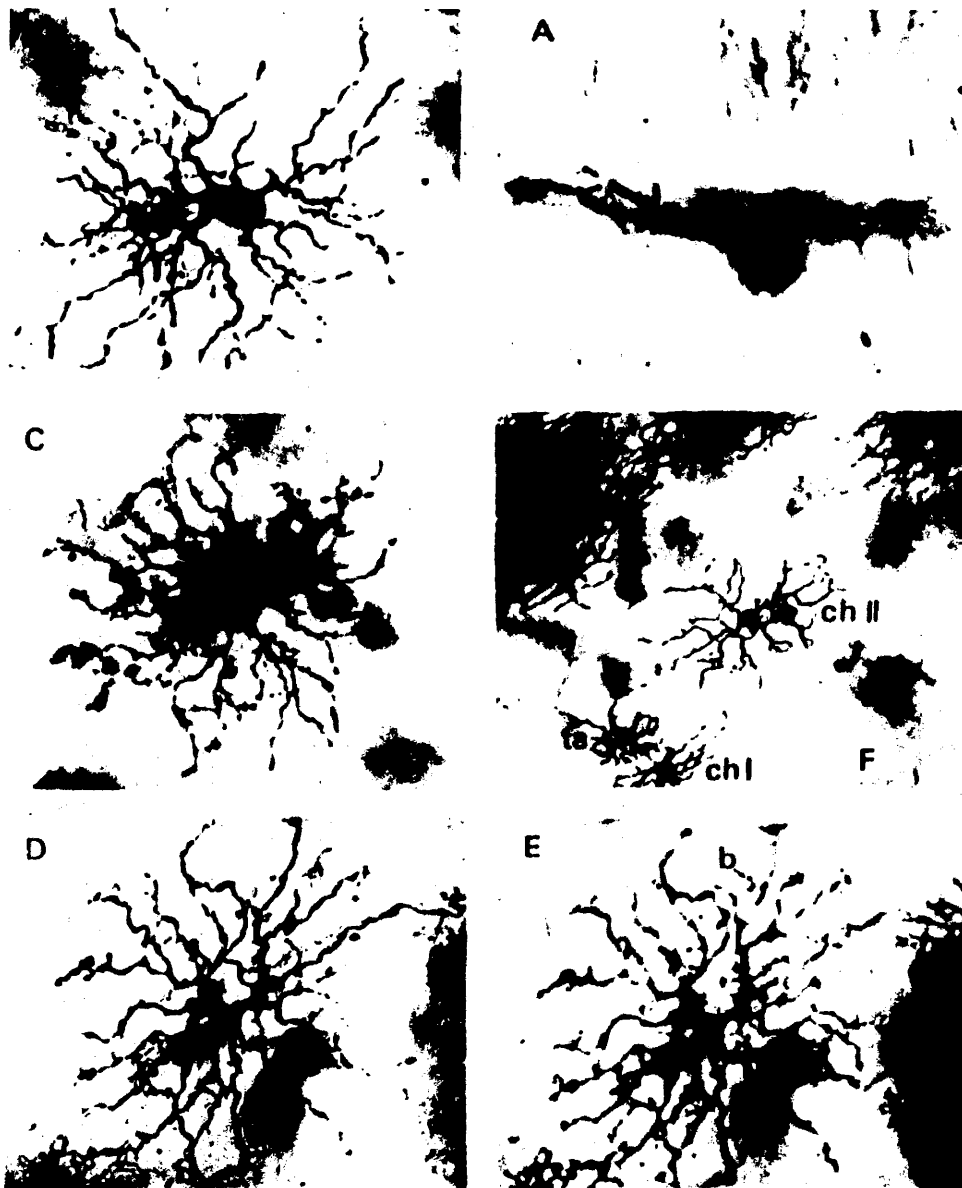


FIG. 38

Retina de embrión de pollo de 18 días método Golgi-Stensaas. Célula horizontal sin axón tipo II.

- A. Corte perpendicular; B y C, el mismo tipo celular visto de plano; D y E, dos planos de enfoque de este tipo celular mostrando los botones terminales (b).  
 F. Microfotografía a pequeña ampliificación mostrando una célula horizontal sin axón tipo I (CHI), otra de tipo II (CHII) y una terminal axónica (TA).

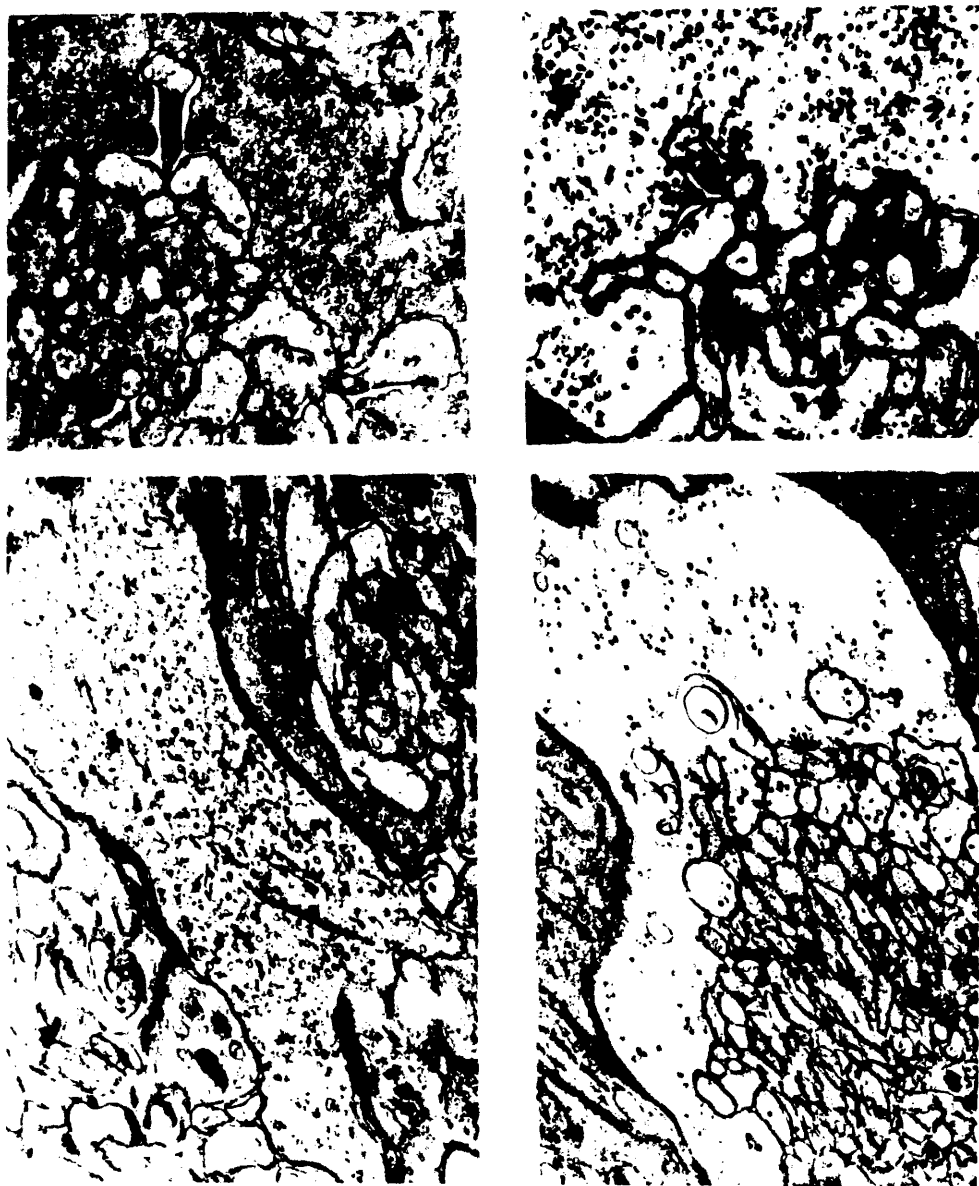


FIG. 39

Retina de pollo (M.E.).

- A y B. Cuerpo sináptico de un cono, con el elemento central de la tríada engrosado en forma de maza (→) y con poca densidad electrónica en la porción postsináptica.
- C. Cuerpo sináptico de un baston "blanco".
- D. Cuerpo sináptico de un cono "blanco".



FIG. 40

Retina de pollo en M.E. sección perpendicular capa plexiforme externa. ch, célula horizontal; ta, terminal axónica; csr, cuerpo sináptico del cono recto; csd, cuerpos sinápticos de los conos dobles.



FIG. 41

Retina de pollo M.E. Fotografía tomada de una preparación hecha con la técnica Golgi-M.E. Cuerpo sináptico de un cono recto (csr); cuerpo sináptico de un cono oblicuo (cso), tres procesos del plexo común a los dos cuerpos sinápticos están impregnados con el precipitado de cromato de plata.



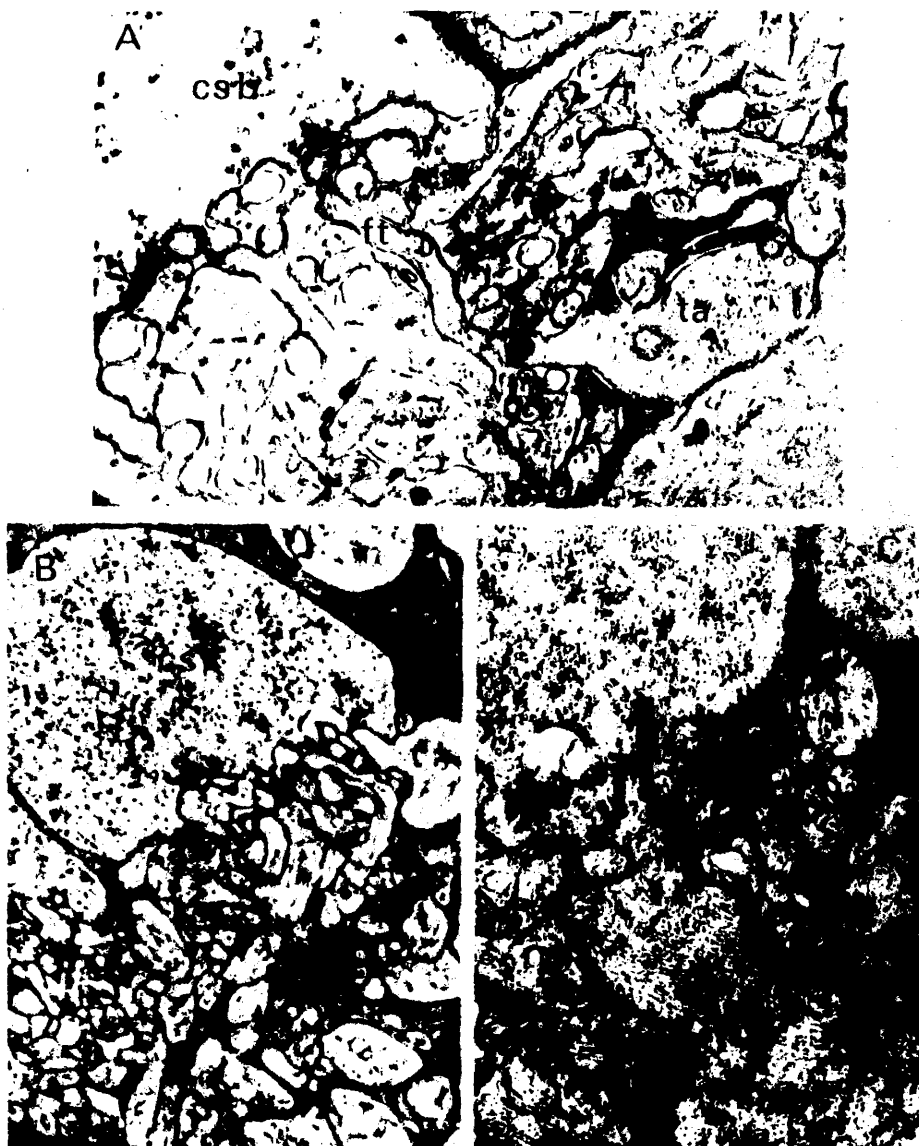


FIG. 42

Retina de pollo M.E.

- A. Fibra terminal (ft) de una terminal axónica (ta) que penetra en una tríada de cono blanco (csb).
- B. Pequeña colateral de una terminal (t) que forma el componente lateral de una tríada del cuerpo sináptico de un cono.
- C. Pequeña colateral de una terminal que forma el componente lateral de una tríada del cuerpo sináptico de un bastón.

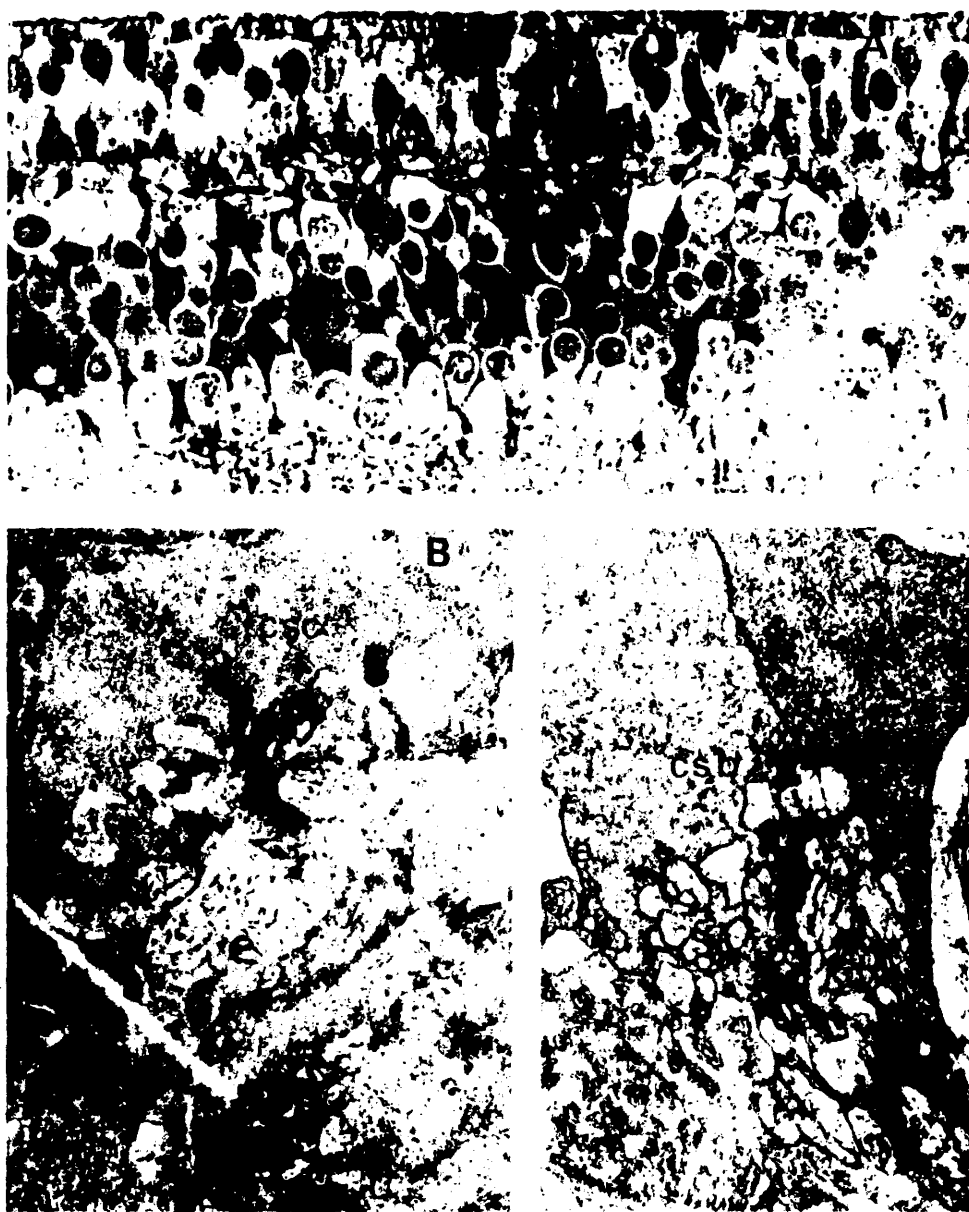


FIG. 43

Retina de pollo técnica de Golgi-M.E,

- A. Célula de axón corto teñida con el método de Golgi-Colonnier aislada y reincluida. Corte perpendicular 2  $\mu$ m.  
(A) axón.
- B. Botón terminal de una dendrita de una célula de axón corto que forma el componente lateral de la tríada de un cono (CSC).
- C. Botón terminal de una terminal axónica que penetra en el complejo sináptico de un bastón (csd).

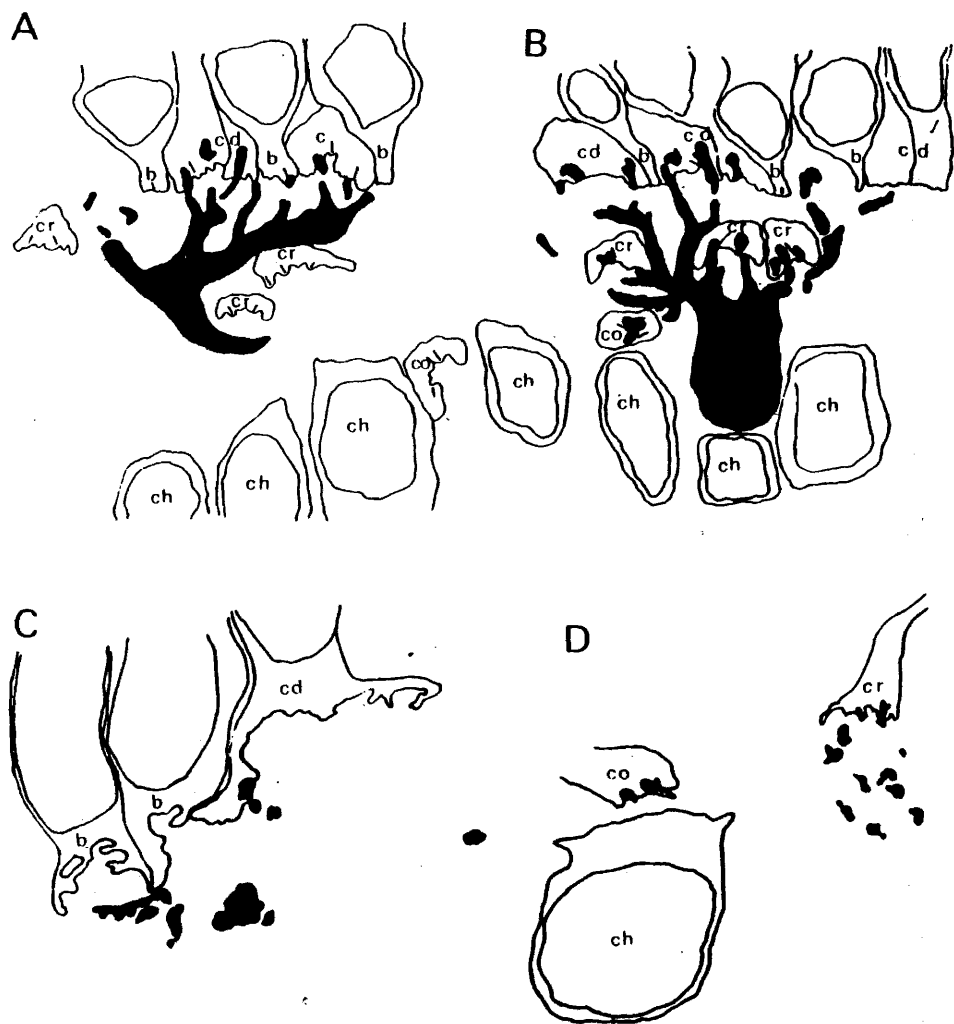


FIG. 44

Dibujos compuestos sobre microfotografías de cortes preparados con la técnica de Golgi-M.E. En negro localización del cromato de plata.

- A. Terminal axónica de la célula de axón corto.
- B. Cuerpo y dendritas de la célula de axón corto.
- C. Fibras terminales de una célula horizontal sin axón tipo I.
- D. Fibras terminales de una célula horizontal sin axón tipo II.

A

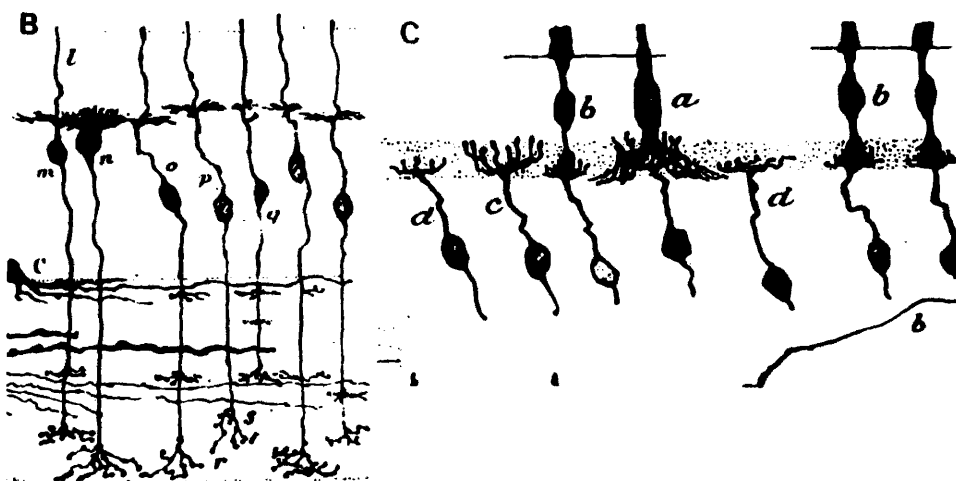


FIG. 45

Células bipolares de la retina de las aves.

A. Retina de pollo (explicación en el texto).

B y C. Dibujos de Cajal (1893) lámina IV.

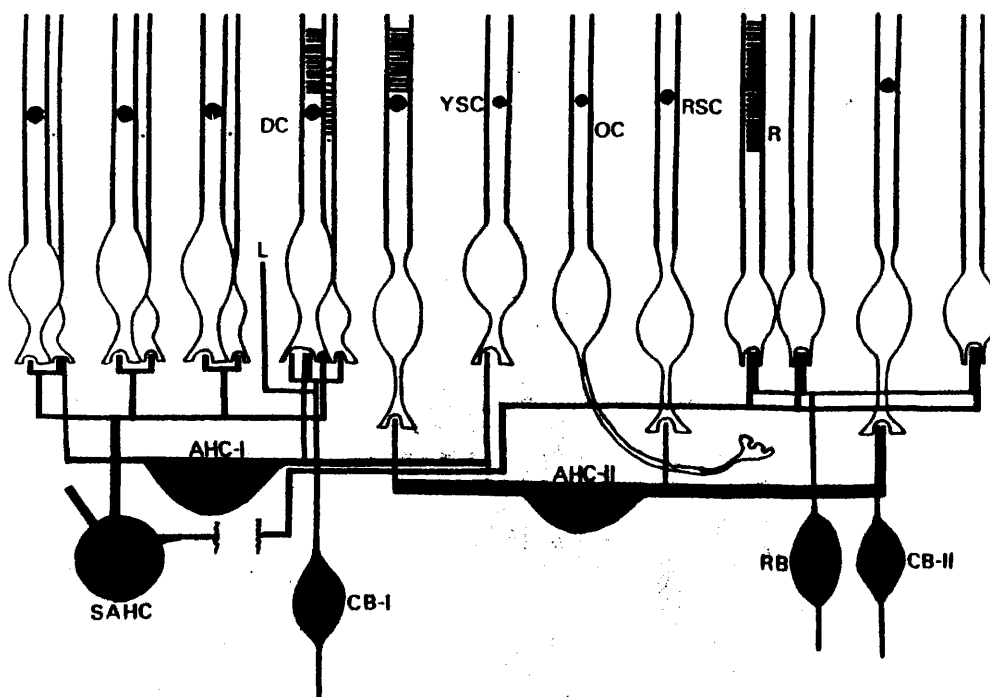


FIG. 46



Dibujo esquemático de las conexiones celulares a nivel de la capa plexiforme externa de la retina de las aves diurnas. DC, cono doble; YSC, cono simple amarillo; OC, cono simple; RSC, cono simple rojo; R, bastón; SAHC, célula horizontal de axón corto; AHC-I, célula horizontal sin axón tipo I; AHC-II, célula horizontal sin axón tipo II; CB-I, bipolar para conos de tipo I; CB-II bipolar para conos de tipo II; RB, bipolar para bastones.